

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Martina Šalomová

**ZMĚNY MOTORICKÝCH FUNKCÍ
U MYŠÍHO MODELU CEREBELÁRNÍ DEGENERACE
V PRŮBĚHU ONTOGENEZE**

**CHANGES MOTOR FUNCTIONS
IN MOUSE MODEL OF CEREbellAR DEGENERATION
IN THE COURSE OF THE ONTOGENESIS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Dana Jelínková, Ph.D.

PRAHA 2017

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky, RNDr. Dany Jelínkové, Ph.D. a uvedla jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. 7. 2017

Podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, RNDr. Daně Jelínkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za její laskavý a pozitivní přístup. Obrovský dík patří našemu konzultantovi doc. MUDr. Janu Cendelínovi, Ph.D. nejen za cenné rady, metodickou a odbornou pomoc a podnětnou kritiku, ale především za ochotu, trpělivost a čas, který nám věnoval. Pracovnímu kolektivu Ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni děkuji za pomoc při provedení některých pokusů a RNDr. Filipu Tichánkovi za rady a pomoc při statistickém zpracování dat. Dále děkuji své rodině a přátelům za všeobecnou podporu nejen při psaní této práce.

ABSTRAKT

Mozeček zasahuje do řady důležitých a komplexních procesů v organismu. Zajišťuje koordinaci pohybů, motorické učení a hraje významnou roli v kognitivních a afektivních funkcích. Při cerebelárních degeneracích se tak setkáváme nejen s motorickými poruchami, ale i s behaviorálními abnormalitami, které se souhrnně označují jako kognitivně-afektivní syndrom.

Cílem práce bylo, pomocí přístrojů pro kvantitativní analýzu chůze a rotarodu, zkoumat motorické funkce v průběhu ontogeneze u myších modelů hereditární cerebelární degenerace - mutantních myší Lurcher a Purkinje cell degeneration. Dalším cílem bylo sledovat vliv fyzické aktivity na míru ataxie a projevy myší v klasických behaviorálních testech.

Výsledky potvrdily významné rozdíly motorických schopností mezi mutanty a zdravými myšmi. Odlišnosti byly pozorované i u některých parametrů chůze, především v rychlosti chůze a parametrech s ní korelujících. Během ontogeneze se motorické funkce u většiny skupin myší nezměnily, s výjimkou myší pcd, které zhoršily svůj výkon na rotarodu. Vliv fyzické aktivity nebyl, vyjma testu nuceného plavání, zjištěn. Fyzická aktivita o námi nastavené intenzitě neměla žádný příznivý účinek na motorické projevy myší.

Klíčová slova:

Analýza chůze, ataxie, cerebelární degenerace, funkce mozečku, Lurcher, motorické funkce, mozeček, nucená fyzická aktivita, pcd, Purkyňovy buňky

ABSTRACT

The cerebellum affects a number of important and complex processes in the organism. It ensures coordination, motor learning and plays an important role in cognitive and affective functions. In the case of cerebellar degeneration, we find not only the movement disorders but also behavioral abnormalities, collectively referred to as cognitive-affective syndrome.

The aim of this work was to investigate motor functions during ontogenesis in animal models of hereditary cerebellar degeneration - mutant mice Lurcher and Purkinje cell degeneration using the device for quantitative gait analysis and rotarod. In addition, the effect of physical activity on the extent of ataxia and manifestations in classical behavioral tests was monitored.

The results confirmed significant differences in motor skills between mutant and healthy mice; differences were also observed in some gait parameters, especially in walking speed and parameters that correlate with it. The motor functions of most groups of mice did not change during ontogenesis, pcd mice deteriorated their performance on the rotarod. The effect of physical activity was not found, with the exception of Forced swimming test. Physical activity of set intensity did not have any beneficial effect on the motoric manifestations of the mice.

Keywords:

Ataxia, cerebellar degeneration, cerebellar function, cerebellum, enforced physical activity, gait analysis, Lurcher, motor function, pcd, Purkinje cell

OBSAH

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
2. ÚVOD.....	10
2.1. Mozeček	10
2.1.1. Základní anatomie mozečku.....	10
2.1.2. Funkce mozečku	11
2.1.3. Patologie mozečku	12
2.2. Zvířecí modely cerebelárních poruch.....	14
2.2.1. Mutantní myši typu Lurcher	15
2.2.2. Mutantní myši pcd (Purkinje cell degeneration).....	18
2.3. Vliv fyzické aktivity	19
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	20
4. MATERIÁL A METODY	21
4.1. Použitá zvířata	21
4.2. Design pokusu	22
4.3. Nucená fyzická aktivita.....	24
4.4. Vyšetření chůze	24
4.4.1. CatWalk.....	25
4.4.2. DigiGait	28
4.5. Rotarod.....	30
4.6. Test svalové síly (Grip strength test).....	30
4.7. Behaviorální testy.....	31
4.7.1. Test v otevřeném poli (Open field test - OFT)	31
4.7.2. Test rozeznávání nových objektů (Novel object recognition test - NORT) ...	32
4.7.3. Vyvýšené křížové bludiště (Elevated plus maze - EPM)	33
4.7.4. Akustická úleková reakce a prepulsní inhibice (Acoustic startle response + prepulse inhibition - ASR + PPI):	34
4.7.5. Test nuceného plavání (Forced swimming test - FST).....	37

4.8. Odběr vzorků	37
4.9. Metodika statistických analýz	37
5. VÝSLEDKY	40
5.1. Motorické funkce v průběhu ontogeneze.....	40
5.1.1. Kvantitativní analýza chůze pomocí systému CatWalk	40
5.1.2. Posouzení motorických schopností na rotarodu	51
5.1.3. Měření svalové síly	54
5.2. Motorické funkce u šestiměsíčních myší a zhodnocení vlivu nucené fyzické aktivity.....	56
5.2.1. Kvantitativní analýza chůze pomocí systému CatWalk	56
5.2.2. Kvantitativní analýza chůze pomocí systému DigiGait	64
5.3. Výsledky behaviorálních testů a zhodnocení vlivu nucené fyzické aktivity	70
5.3.1. Test v otevřeném poli	70
5.3.2. Test rozeznávání nových objektů	72
5.3.3. Vyvýšené křížové bludiště	74
5.3.4. Akustická úleková reakce a prepulsní inhibice	76
5.3.5. Test nuceného plavání.....	78
5.4. Měření hmotnosti nadledvin	80
6. DISKUSE.....	81
6.1. Kvantitativní analýza chůze v průběhu ontogeneze	81
6.2. Kvantitativní analýza chůze u šestiměsíčních myší	82
6.3. Porovnání přístrojů CatWalk a DigiGait	84
6.4. Posouzení motorických dovedností na rotarodu v průběhu ontogeneze	85
6.5. Vliv nucené fyzické aktivity na motorické projevy myší	86
6.6. Vliv nucené fyzické aktivity na behaviorální projevy myší.....	87
7. ZÁVĚR	90
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	91
9. SEZNAM PŘÍLOH	96

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD SCA	autozomálně dominantní spinocerebelární ataxie (<i>autosomal dominant spinocerebellar ataxia</i>)
ADHD	hyperaktivita s poruchou pozornosti (<i>attention deficit hyperactivity disorder</i>)
AIC	Akaikeho informační kritérium (<i>Akaike's information criterion</i>)
ASR	akustická úleková reakce (<i>acoustic startle response</i>)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BH korekce	korekce pro mnohočetná porovnání podle Benjamini-Hochberg
CCP1	cytosolická karboxypeptidáza 1 (<i>cytosolic carboxypeptidase 1</i>)
CNS	centrální nervová soustava (<i>central nervous system</i>)
CV	variační koeficient (<i>coefficient of variation</i>)
D.F.	stupně volnosti (<i>degrees of freedom</i>)
EA-1, EA-2	epizodická ataxie typu 1 a 2 (<i>episodic ataxia type 1 and 2</i>)
EPM	vyvýšené křížové bludiště (<i>elevated plus maze</i>)
FST	test nuceného plavání (<i>forced swimming test</i>)
GLS	metoda zobecněných nejmenších čtverců (<i>generalized least square model</i>)
GluRδ2	δ2 podjednotka glutamátového receptoru
Lc	Lurcher
LED	dioda vyzařující světlo (<i>Light emitting diode</i>)
LTP	dlouhodobá potenciace (<i>long-term potentiation</i>)
NO	nový objekt
NORT	test rozeznávání nových objektů (<i>novel object recognition test</i>)
n.s.	nesignifikantní rozdíl (<i>non-significant</i>)
OFT	test v otevřeném poli (<i>open field test</i>)
P (P8)	postnatální období (osmý postnatální den)
pcd	Purkinje cell degeneration
PK	přední končetiny
PPI	prepulsní inhibice (<i>prepulse inhibition</i>)

SCA1, SCA2	spinocerebelární ataxie typu 1 a 2 (<i>spinocerebellar ataxia type 1 and 2</i>)
SELČ	středoevropský letní čas
SO	starý objekt
VPI	technologie ventral plane imaging
WT	wild type
ZK	zadní končetiny

2. ÚVOD

2.1. Mozeček

2.1.1. Základní anatomie mozečku

Mozeček (*cerebellum*) je uložen v zadní jámě lebeční dorzálně od prodloužené míchy a Varolova mostu. Je tvořen dvěma hemisférami (*hemisferiae cerebelli*), mezi nimiž podélně leží úzký střední pás – mozečkový červ (*vermis cerebelli*). Povrch mozečku je členitější než povrch velkého mozku a tvoří jej četné transversální brázdy (*fissurae*), oddělující jednotlivé úseky na hemisférách i vermis. Největší a nejhlubší fisury (*fissura prima* a *fissura posterolateralis*) oddělují 3 hlavní laloky - *lobus flocculonodularis*, *lobus anterior* a *lobus posterior*. Laloky jsou menšími fisurami rozdělené na několik lobulů a ty jsou dále dělené na folia (Čihák, 1997).

Povrch mozečku je celistvě kryt šedou hmotou - kůrou (*cortex cerebelli*), která je z histologického hlediska členěna na tři vrstvy. Svrchní vrstvou je vrstva molekulární (*stratum moleculare*), obsahující buňky hvězdicovité a košíčkové, které zajišťují laterální inhibici sousedních Purkyňových buněk. Pod ní se nachází vrstva ganglionární (*stratum gangliosum*), tvořená řadou Purkyňových buněk, jejichž bohaté dendritické stromy se větví v molekulární vrstvě. Purkyňovy buňky jsou klíčovými elementy, protože jsou jedinými projekčními neurony kůry mozečku a jejich axon tak tvoří její jedinou eferentní dráhu. Nejhlouběji je uložena vrstva granulární (*stratum granulosum*), ve které se nachází četné granulární buňky a buňky Golgiho (Čihák, 1997). Jsou zde zastoupeny i tzv. netradiční neurony mozečkové kůry - Lugarovy buňky a neurony unipolar brush, synarmotic, perivascular a candelabrum (Ambrosi et al., 2007). Pod kůrou je uložena bílá hmota - dřeň (*corpus medullare*), tvořená neuroglií a nervovými vlákny. Bílá hmota na sagitálním řezu vermis tvoří příznačnou stromkovitou kresbu (strom života). V bílé hmotě jsou uloženy čtyři párové shluky šedé hmoty - mozečková jádra *nucleus dentatus*, *emboliformis*, *globosus* a *fastigii* (Čihák, 1997).

Mozeček je spojen s mozkovým kmenem pomocí tří párů stvolů (*pedunculi cerebellares*), které obsahují dráhy aferentní i eferentní. Aferentní dráhy mozečku jsou spinocerebelární (přivádějí informace z proprioreceptorů a exteroceptorů přes spinální míchu), bulbopontomezencefalické (vestibulocerebelární, olivocerebelární,

retikulocerebelární, tektocerebelární, rubrocerebelární, z jader trigeminu a z *nucleus cuneiformis*) a kortikopontocerebelární (informace z mozkové kůry). Do mozečkové kůry, kde probíhá zpracování všech aferentních spojů, se informace dostávají pomocí dvou typů vláken. Šplhavá vlákna vedoucí z olivárního komplexu k Purkyňovým buňkám jsou tenká a inervují vždy jen jednu Purkyňovu buňku. Mechová vlákna jsou myelinizovaná a vedou z jader míchy, *nucleus gracilis*, *nucleus cutaneus*, jader hlavových nervů v retikulární formaci a *nucleus pontis*. Po vstupu do mozečkové kůry směřují ke glomerulům v granulórní vrstvě. Aferentní informace pak jdou k Purkyňovým buňkám přímo paralelními vlákny, tj. axony granulórních buněk, nebo prostřednictvím dalších interneuronů. Purkyňovy buňky jsou tedy aktivovány paralelními vlákny nebo inhibovány hvězdovitými a košíčkovými buňkami. Jsou-li Purkyňovy buňky excitovány, tlumí činnost mozečkových jader, jsou-li naopak inhibovány, neurony jader se stávají aktivními.

Pouze malá část vláken vedoucích z mozečkové kůry směřuje přímo do vestibulárních jader, případně do retikulární formace. Většina se přepojuje v mozečkových jádrech a dále pak vede do vestibulárních jader, retikulární formace, jader hlavových nervů a po přepojení v thalamu do mozkové kůry (Myslivoček, 2003).

2.1.2. Funkce mozečku

Mozeček zabezpečuje udržování rovnováhy, koordinaci pohybů a regulaci svalového tonu kosterního svalstva. Tyto funkce jsou zajišťovány třemi funkčně a fylogeneticky odlišnými částmi mozečku. *Archicerebellum* (vestibulární mozeček) je nejstarší část mozečku, dostává podněty převážně z rovnovážného ústrojí, má vliv na udržování vzpřímené polohy těla a koordinaci pohybu hlavy a očí. *Paleocerebellum* (spinální mozeček) získává informace z proprioreceptorů, exteroceptorů i interoreceptorů, prostřednictvím inhibičního sestupného systému retikulární formace reguluje svalový tonus a koordinuje posturální motoriku. *Neocerebellum* (korový mozeček) je vývojově nejmladší částí, je významné pro koordinaci pohybů akrálních částí končetin. Aferentní spoje do této části přicházejí především z primárních motorických oblastí mozkové kůry (Čihák, 1997; Ambler, 2011). Mozeček tak zajišťuje, aby každý volný pohyb byl plynulý, cílený a přiměřený dané situaci. Je nejen schopen porovnávat aktuální a budoucí stav jednotlivých částí těla se stavem zamýšleným, ale

také se podílí na zpětnovazebné regulaci pohybu a provádí tak případnou korekci. Významná je právě schopnost predikce, díky které lze korekci pohybu zahájit včas (Ambler, 2011). Pokusem o vysvětlení principu řízení pohybů mozečkem je teorie tzv. vnitřního modelu (Kawato et al., 1987; Ito, 2008). V novějších studiích bylo také prokázáno, že mozeček hraje významnou roli v kognitivních funkcích, podílí se na motorickém učení a organizaci vyšší nervové činnosti (Schmahmann & Sherman, 1997). Mozeček má také vliv na emocionální procesy, u myši s cerebelární degenerací byly pozorovány změny v úrovni anxiety, míry stresovanosti a explorační aktivity (Cendelín et al., 2014; Tůma et al., 2017).

2.1.3. Patologie mozečku

Na poškození mozečku má vliv mnoho aspektů. Možnou příčinou může být akutní nebo chronická intoxikace etanolem nebo jinými návykovými látkami, ale i některými farmaky. Poškození mozečku mohou způsobit i traumata, vývojové vady, mozečkové nádory, ischemie nebo hemoragie, roztroušená skleróza, záněty (cerebelitida) nebo různé dědičné cerebelární degenerace, jako např. autozomálně recesivní Friedreichova ataxie, ataxia teleangiectatica, abetalipoproteinémie, ataxie s izolovaným deficitem vitamínu E, autozomálně dominantní epizodické ataxie typu 1 a 2 (EA-1, EA-2) nebo autozomálně dominantní spinocerebelární ataxie (AD SCA), kterých v současné době známe několik desítek typů a stále jsou popisovány nové (Masopust et al., 2005; Taroni et al., 2013).

Poruchy mozečku se projevují nejčastěji jako zánikový mozečkový syndrom, jehož motorická složka je označována jako motorický mozečkový syndrom a zahrnuje mozečkovou ataxii, třes a pasivitu (poruchy svalového tonu) (Ambler, 2011). Ataxie je definována jako porucha koordinace pohybů. Základními složkami mozečkové ataxie jsou asynergie (ztráta souhry svalových skupin), dysmetrie (chybné cílení), hypermetrie (přestřelování zamýšleného cíle), adiadochokineze (neschopnost vykonávat rychlé střídavě protichůdné pohyby) a dysartrie (poruchy řeči) (Ambler et al., 2004). Při paleocerebelárním syndromu, který zahrnuje poškození paleocerebela a archicerebela (selektivní poškození samotného archicerebela je vzácné), dochází k tzv. trupové ataxii. Je výrazně narušena rovnováha, postoj i chůze je o široké bázi, ataktická, kymácivá a často dochází také k pádům, vrávorání do stran (lateropulse), ale i dozadu (retropulse)

nebo dopředu (propulse). Neocerebelární syndrom je charakterizován ataxií končetin narušující cílené pohyby. Projevy paleocerebelárního a neocerebelárního syndromu se často kombinují a vzniká tzv. smíšený (globální) mozečkový syndrom.

Protikladem zánikového syndromu je iritační syndrom, který se vyskytuje vzácněji a svými projevy (klidový třes, zvýšený plastický tonus flexorů, flekční držení trupu a končetin, hypokinéza až akinéza) do jisté míry připomíná parkinsonismus (Vožeh, 2011).

Značná část cerebelárních poruch bývá spojena s kognitivními a emočními změnami, které jsou u lidí známé jako cerebelární kognitivně-afektivní syndrom, dnes označovaný také jako Schmahmannův syndrom (Schmahmann & Sherman, 1997). Pozorované behaviorální defekty byly klinicky významné u pacientů s lézí posteriorního lobe a *vermis*. Tyto změny vedou ke všeobecně sníženému intelektu. Zahrnují zhoršení exekutivních funkcí, jako je schopnost plánování, abstraktní uvažování, pracovní paměť nebo prostorová orientace. Byly sledované i poruchy pozornosti, perseverace či změny osobnosti (oploštěná emotivita, otupělost, desinhibované nevhodné chování, emocionální labilita). Výrazné jsou i poruchy v plynulosti řeči, dysprosodie, dramatismus, objevuje se i mírná anomie. Jisté abnormality mozečku byly objeveny i u mnohých psychiatrických onemocnění, jako je schizofrenie, úzkostné poruchy, ADHD nebo demence a především poruchy autistického spektra (Mostofsky et al., 1998; Schmahmann & Sherman, 1998; Konarski et al., 2005; Sakai et al., 2005; Masopust et al., 2005; Crippa et al., 2016).

Jak významnou úlohu hraje mozeček v patofyziologii autismu je v současné době předmětem diskusí. Mozeček zajišťuje nejen koordinaci smyslových funkcí, ale je spojen i s funkcí sociálních interakcí. Posmrtná vyšetření některých autistů přinesla důkazy o řadě anomálií mozečku, nejpozoruhodnější bylo rozsáhlé poškození až ztráty Purkyňových buněk, které mohou vést k dysfunkci prefrontálního kortexu. Byly zjištěny i celkové objemové změny mozečku – snížení objemu šedé hmoty, naopak zvýšení objemu bílé hmoty (Allen, 2006).

Dysfunkce mozečku je u autistů velmi častá a způsobuje zhoršenou motorickou obratnost, která je zřetelná zejména u Aspergerova syndromu. Některé projevy autismu se shodují s projevy kognitivně-afektivního syndromu. Neschopnost koordinovat pohyb různých částí těla, zhoršená jemná motorika a lehce nestabilní a

roztřesená chůze jsou rysy společné pro pacienty s cerebelární degenerací a pacienty trpící autismem. Lze tedy soudit, že zvířecí modely cerebelární degenerace je možné z určitého hlediska využít i jako modely určitých rysů autismu (Dickson et al., 2010; Rogers et al., 2013).

Myší mutantní modely cerebelárních poruch jsou v praxi využívány zejména pro podobnost některých symptomů s lidskými nemocemi. V nedávné době však byly objeveny přesně tytéž mutace i u lidí. Byly identifikovány dvě nepříbuzné rodiny s cerebelární ataxií, abnormálními očními pohyby a s celkovým vývojovým zpožděním, způsobeným mutací *Grid2*, která odpovídá myším modelům hot-foot (Hills et al., 2013). A v roce 2015 v Alžírsku byla dokonce objevena rodina, jejíž několik členů trpí shodnou mutací jako myši Lurcher (Coutelier et al., 2015), které byly popsány již v roce 1960 (Phillips, 1960) a které jsou hlavním předmětem této práce.

Pro široké spektrum dědičných degenerací mozečku doposud nebyla nalezena žádná efektivní kauzální léčba. Hlavním terapeutickým přístupem je intenzivní rehabilitace zaměřená na pomoc pacientovi trénovat pohyby a zlepšit tak motorické dovednosti a naučit se s nemocí žít.

2.2. Zvířecí modely cerebelárních poruch

Pro výzkum funkce mozečku, jeho poruch a následků jeho poškození, patogeneze degenerativních onemocnění mozečku nebo terapeutických možností se využívá celá řada zvířecích modelů, které trpí cerebelární atrofií. Kromě v této práci použitých myší Lurcher (mutace *Grid2^{Lc}*) a myší pcd – Purkinje cell degeneration (mutace *Agtpbp1^{pcd}*) jsou známí i spontánní mutanti s mutacemi *Grid2^{ho}* (hot-foot), *Rora^{sg}* (stagerrer), *nr* (nervous), *Reln^{rl}* (reeler) a *Girk2^{Wv}* (weaver). Tyto zvířecí modely se vzájemně liší rozsahem a průběhem degenerace jednotlivých typů neuronů v mozečku. U některých mutací dochází ke změnám dalších struktur mozku i mimo centrální nervový systém (inferiorní olivy, talamických jader, mitrálních buněk nebo retinofotoreceptorů). Kromě přirozených mutantů se využívají i myši vzniklé uměle indukovanou mutací. Jedná se např. o transgenní myši SCA1 a SCA2, které jsou modelem lidské spinocerebelární ataxie typu 1 a 2 (Lalonde & Strazielle, 2007).

2.2.1. Mutantní myši typu Lurcher

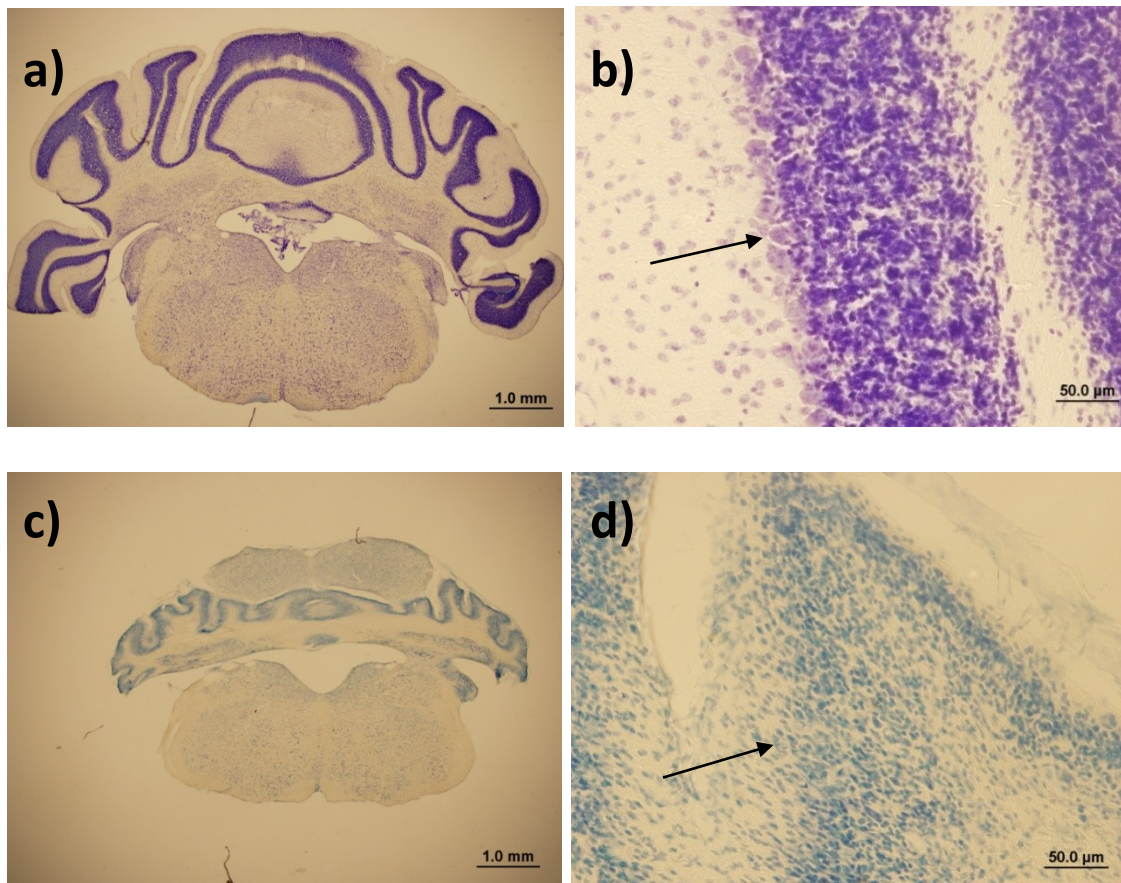
Mutantní myši typu Lurcher jsou stěžejním modelem pro tuto diplomovou práci a zároveň jedním z nejpoužívanějších modelů olivocerebelární degenerace. Jsou využívány pro anatomické, fyziologické, behaviorální i molekulární studie, které poskytují znalosti o interakci mozečku se zbytkem CNS a pro porozumění funkce CNS od vývoje až k jeho vlivu na chování (Vogel et al., 2007).

Myši Lurcher byly objeveny v myší kolonii v ústavu Medical Research Council Radiobiological Research Unit v Harwelu v Anglii v roce 1954 a poprvé byly popsány Ritou Phillipsovou v roce 1960 (Phillips, 1960). Trpí spontánně vzniklou semidominantní mutací genu *Grid2*, kódujícího $\delta 2$ podjednotku glutamátového receptoru (GluR $\delta 2$) (Zuo et al., 1997), která je exprimována zejména Purkyňovými buňkami mozečku (Araki et al., 1993). V důsledku mutace se receptor mění na trvale otevřený membránový kationtový kanál a výrazně se tak zvyšuje permeabilita membrány, což způsobuje chronickou depolarizaci buňky (Zuo et al., 1997). Vtok Na^+ do buňky je tak pravděpodobně hlavním důvodem následného výrazného úbytku, později až kompletní ztráty Purkyňových buněk (Zuo et al., 1997; Zanjani et al., 2009). Buněčná smrt Purkyňových buněk je primárním efektem mutace a sekundárně vede k redukci granulárních buněk mozečku a neuronů inferiorní olivy (Wetts & Herrup, 1982a,b).

Zpočátku se mozeček myši Lurcher vyvíjí normálně, první abnormality jsou detekovatelné až 3 - 4 dny po narození (Swisher & Wilson, 1977). V době mezi osmým a dvacátým pátým postnatálním dnem (P8 - P25) pak postupně zmizí až 95 % Purkyňových buněk a ve věku 3 měsíců prakticky degenerují všechny Purkyňovy buňky, 90 % granulárních buněk a 75 % neuronů dolní olivy (Caddy & Biscoe, 1979). První zjevné abnormality Purkyňových buněk se vyskytují od P8. Jedná se především o redukci velikosti buňky, zpoždění ve vývoji buněčného těla a dendritických stromů, axonální otoky a poškození, kondenzované jádro, nesouměrnosti jaderné a cytoplazmatické membrány a změny mitochondrií (Caddy & Biscoe, 1979).

Buněčná smrt je popisována na základě různých kritérií jako nekrotická, autofagická nebo apoptotická, případně jako kombinace více procesů (Dumesnil-Bousez & Sotelo, 1992; Zuo et al., 1997; Yue et al., 2002). Smrt Purkyňových buněk má

pro mozeček zásadní význam, jelikož jsou jediným výstupem z kůry mozečku a jejich vyřazení znamená pro mozeček úplnou funkční dekortikaci. Kvůli masivní degeneraci je mozeček postižených myší makroskopicky menší než u myší zdravých (Baurle et al., 2006). Mozeček mutantních myší a jejich zdravých kontrol je zobrazen na obrázku 1.



Obr. 1 a, b, c, d: Koronární řez mozečkem myši typu wild (a, b) a myši Lurcher (c, d). Šipka ukazuje na vrstvu Purkyňových buněk u myši typu wild (b) a místo, kde chybějí u myši Lurcher (d). Barvení podle Nissla.

Jako model neurodegenerace se používají pouze heterozygoti (+/Lc). Postižení homozygoti (Lc/Lc) nejsou pro masivní ztrátu neuronů mozkového kmene během pozdní embryogeneze schopni sát mateřské mléko a umírají během několika dní po narození (Cheng & Heintz, 1997; Resibois et al., 1997). Homozygotní jedinci typu wild (+/+) jsou normální zdravé myši a slouží jako kontroly, se kterými jsou postižené myši srovnávány.

Myši typu Lurcher jsou charakteristické svým ataktickým pohybem, třes pro ně však není typický (Philips, 1960). Při chůzi se trhavě kolébají, často padají ze strany na stranu a je u nich výrazná tzv. retropulse – vrávorání směrem vzad. Kvůli výraznému zhoršení rovnováhy je jejich postoj a chůze velmi vratká. Jejich kroky jsou ve srovnání

se zdravými myšmi kratší, o širší bázi, mají přehnanou flexi zadních nohou ve švihové fázi chůze, často našlapují vícekrát na jednu nohu za sebou, mají větší variabilitu chůze a nejsou schopné běžet takovou rychlostí, jako zdravé myši (Fortier et al., 1987).

Kvůli svému postižení mají zhoršený výkon v základních motorických testech, jako je například rotarod, treadmill, nakloněný žebřík. Navzdory tomu jsou však myši Lurcher schopny zlepšovat své výkony při opakovaných pokusech, mají tedy možnost motorického učení (Lalonde, 1994). Jejich výkony jsou však limitované stupněm obtížnosti – například rychlostí otáčení rotarodu (Caston et al., 1995). Zajímavé je, že například u rotarodu jsou mutanti Lurcher schopni změnit strategii vykonávání testu. Zatímco zdravá myš jen běží a zrychluje podle nastavení přístroje, mutovaná myš se při vyšší rychlosti otáčení přichytí drápky k rotujícímu válci a je tak schopná výrazně prodloužit latenci pádu (Hilber & Caston, 2001).

Mutace neovlivňuje jen motorické dovednosti, ale má velký vliv i na vyšší funkce CNS – na kognitivní a emocionální složku (pro přehled viz Vogel et al., 2007). Myši Lurcher mají zhoršenou prostorovou orientaci, učení a prostorovou paměť. Nejsou schopné tvorby kognitivních map a oproti zdravým myším mají horší výsledky v testech orientace, jsou však schopny určitého pomalejšího učení (Hilber et al., 1998). Také průměrná hmotnost myši Lurcher se ve srovnání se zdravými myšmi téhož kmene liší. Do P12 - P14 je hmotnost zdravých a nemocných myši srovnatelná, poté se myši s mutací Lurcher vyvíjejí pomaleji, méně přibírají a v dospělosti je jejich tělesná hmotnost nižší než u zdravých zvířat (Phillips, 1960). Mají tedy i menší svalovou sílu, a proto mají zhoršené výkony i ve fyzicky strukturovaných úkolech (Hilber & Caston, 2001). Bylo také zjištěno, že samice Lurcher mají méně početné vrhy (Phillips, 1960).

Myši Lurcher vykazují i neurochemické a metabolické změny, endokrinní a imunologické abnormality a různé behaviorální deficity. Byla u nich zjištěna zvýšená hladina adrenokortikotropního hormonu a kortikosteronu po expozici stresogenním podmínkám (Frederic et al., 1997; Hilber et al., 2004). Abnormality byly sledovány i v emocionálním chování (Cendelin et al., 2014). Na vyvýšeném křížovém bludišti, které je zaměřené na zkoumání anxiety, trávili mutovaní jedinci více času v otevřených ramenech než jejich zdravé kontroly (Monnier & Lalonde, 1995; Hilber et al., 2004). Hladina kortikosteronu v plazmě však byla u zdravých jedinců nižší (Frederic et al.,

1997; Hilber et al., 2004). Lze tedy soudit, že myši Lurcher jsou sice náchylnější ke stresu, avšak úroveň jejich úzkostnosti je nižší (Lister, 1990).

Projevy mutace *Grid2^{Lc}* mohou být ovlivněny v závislosti na genetickém pozadí. Při porovnávání kmenů B6CBA a C3H bylo zjištěno, že pro studium chování je vhodnější kmen B6CBA, protože nekombinuje abnormality spojené s mutací *Grid2^{Lc}* se specifickými problémy kmene, jako je např. degenerace sítnice, zjištěná u některých myší kmene C3H. Ztráta fotoreceptorů způsobuje funkční slepotu a vede k výraznému narušení vizuální orientace, což značně ovlivňuje výsledky testů (Cendelin et al., 2014).

2.2.2. Mutantní myši pcd (Purkinje cell degeneration)

Myši pcd trpí autozomálně recesivní mutací genu *Agtbp1*, který kóduje cytosolickou karboxypeptidázu 1 (CCP1).

Heterozygoti a nepostižení homozygoti jsou fenotypově vzájemně neodlišitelné zdravé myši, zatímco postižení homozygoti trpí degenerací populace Purkyňových buněk, která se rapidně zmenšuje a do čtvrtého postnatálního týdne téměř celá zmizí. Jako sekundární důsledek ztráty Purkyňových buněk přichází později i pozvolná degenerace granulárních buněk a mozečkových jader, dochází i k mírné degeneraci neuronů dolní olivy. Kromě toho, myši pcd jsou také postiženy postupnou degenerací mitrálních buněk čichového bulbu, mírnou degenerací talamických jader a retinofotoreceptorů. Kompletní retinální degenerace přichází do jednoho roku života. (Fernandez-Gonzalez et al., 2002).

Stejně jako myši typu Lurcher, i pcd mají kvůli dysfunkci Purkyňových buněk výrazně zhoršené motorické dovednosti oproti jejich zdravým kontrolám. Trpí výraznou ataxií, mají poruchu prostorového učení a nejsou schopni navigace ke skrytému cíli (Goodlett et al., 1992). Myši pcd mají sníženou hmotnost oproti zdravým kontrolám. Plodnost homozygotních mutantních samců je výrazně narušena, samice jsou sice plodné, ale mají vážné potíže s odchovem mláďat (Mullen et al., 1976).

2.3. Vliv fyzické aktivity

Fyzická aktivita má pozitivní vliv na kognitivní funkce (Fordyce & Wehner, 1993) a zlepšuje paměť a učení tím, že u dospělých jedinců zvyšuje neurogenezi v *gyrus dentatus* v hipokampu, v oblasti důležité pro paměťové funkce (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). V Morrisově vodním bludišti bylo na potkanech prokázáno zlepšení prostorového učení po pravidelném fyzickém cvičení (Ahmadiasl et al., 2003). Mimo to, cvičení usnadňuje funkční regeneraci po poranění mozku (Grealy et al., 1999), zvyšuje synaptickou plasticitu (Vaynman et al., 2006) a s tím spojenou dlouhodobou potenciaci (LTP) (Patterson et al., 1992).

Hlavní roli ve zprostředkování efektu cvičení na synaptickou plasticitu neuronů a kognitivní funkce hraje mozkový neurotrofní faktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Ukázal se jako významný modulátor synaptické plasticity v dospělém mozku, zejména v hipokampu. Delece nebo inhibice genu *BDNF* způsobí deficit dlouhodobé potenciace, mechanismu, na kterém je založeno učení a paměť (Molteni et al., 2004; Vaynman et al., 2003, 2004, 2006). Bylo prokázáno, že se vlivem cvičení zvyšuje hipokampanální hladina BDNF (Gómez-Pinilla et al., 2001; Molteni et al., 2002), což podporuje přežívání stávajících neuronů, růst a diferenciaci nových neuronů a posílení nervových spojů.

Pohybová terapie je proto součástí léčby mnoha neurologických onemocnění. V případě cerebelárních degenerací patří rehabilitace dokonce k základní terapii, přestože nedokáže zabránit progresi onemocnění (Ilg et al., 2010; Miyai et al., 2012). Jejím cílem je zlepšení motorické koordinace, respektive zpomalení prohlubování její poruchy a trénink náhradních pohybových vzorců. Malá pozornost je však věnována účinku pohybové terapie na kognitivně-afektivní složku zánikového mozečkového syndromu.

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavní cíl:

Popsat změny motorických funkcí u myšího modelu dědičné cerebelární degenerace v průběhu ontogeneze.

Dílčí cíle:

- 1) Kvantitativně analyzovat ataxii a změny chůze u myších modelů cerebelární degenerace během ontogeneze.
- 2) Posoudit motorické schopnosti myší s cerebelární degenerací klasickou metodou – na rotarodu.
- 3) Zhodnotit vliv nucené fyzické aktivity na motorické projevy myší.
- 4) Zhodnotit vliv nucené fyzické aktivity na behaviorální aktivitu myší.
- 5) Zprovoznit přístroj DigiGait, ověřit jeho použitelnost pro kvantitativní analýzu chůze a porovnat s již zavedeným přístrojem CatWalk.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Použitá zvířata

Stěžejním materiálem pro tuto práci byly myši typu Lurcher (+/Lc) a wild (+/+) kmene B6CBA z chovu Ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni. Kvůli snížení vlivu pohlaví na výsledky behaviorálních testů byli použiti samci i samice a to přibližně v poměru 1:1 v každé experimentální skupině. Pokusné myši byly získány křížením samce typu Lurcher se samicí typu wild téhož kmene. Samice Lurcher se pro svou špatnou schopnost péče o mláďata k chovu nepoužívají. Křížením heterozygota (+/Lc) s nepostiženým homozygotem (+/+) vznikla přibližně polovina mláďat s cerebelární degenerací (typ Lurcher) a polovina zdravých mláďat (typ wild), která sloužila jako kontroly. Zároveň bylo zajištěno, že se nenarodil žádný postižený homozygot (Lc/Lc), který by nebyl pro svou extrémní ztrátu neuronů životaschopný a tudíž i nepoužitelný pro výzkum.

Vedle těchto myší byly použity i myši kmene B6.BR typu pcd (pcd/pcd) a typu wild (+/pcd nebo +/+). Kvůli obtížnějšímu chovu těchto myší, horšímu přežívání pcd mutantů a menší pravděpodobnosti narození jedinců s cerebelární degenerací (jedná se o recesivní mutaci) byly v této práci použity pouze pro doplnění.

Zvířata byla chována za standardních podmínek: teplota (20 - 24 °C), relativní vlhkost (30 - 60 %), střídání period světla a tmy po 12 hodinách (6:00 - 18:00 / 18:00 - 6:00 SELČ), dostupnost potravy a vody – *ad libitum*. Myši byly umístěny v plastových boxech s kovovým víkem po 1 - 4 jedincích. Rozměry boxů byly 24 x 18 x 15 cm pro 1 - 2 jedince nebo 37 x 18 x 15 cm pro 2 - 4 jedince. Každý box byl vybaven plastovým domečkem a vystlán komerčně dodávanou podestýlkou z dřevěných hoblin, která byla pravidelně vyměňována.

Celkem bylo testováno 64 myší. Některá zvířata však uhynula nebo musela být z experimentů vyřazena. Do statistického zpracování tedy bylo nakonec zahrnuto 59 myší, které byly rozděleny do šesti experimentálních skupin (tab 1). Z technických důvodů chybí u některých testů data určitých myší. Rozsahy souborů pro jednotlivé testy jsou uvedeny na příslušném místě v kapitole 5 - Výsledky.

Všechny pokusy byly prováděny v souladu s etickými a právními normami EU a se souhlasem Odborné komise pro práci s pokusnými zvířaty LF UK v Plzni.

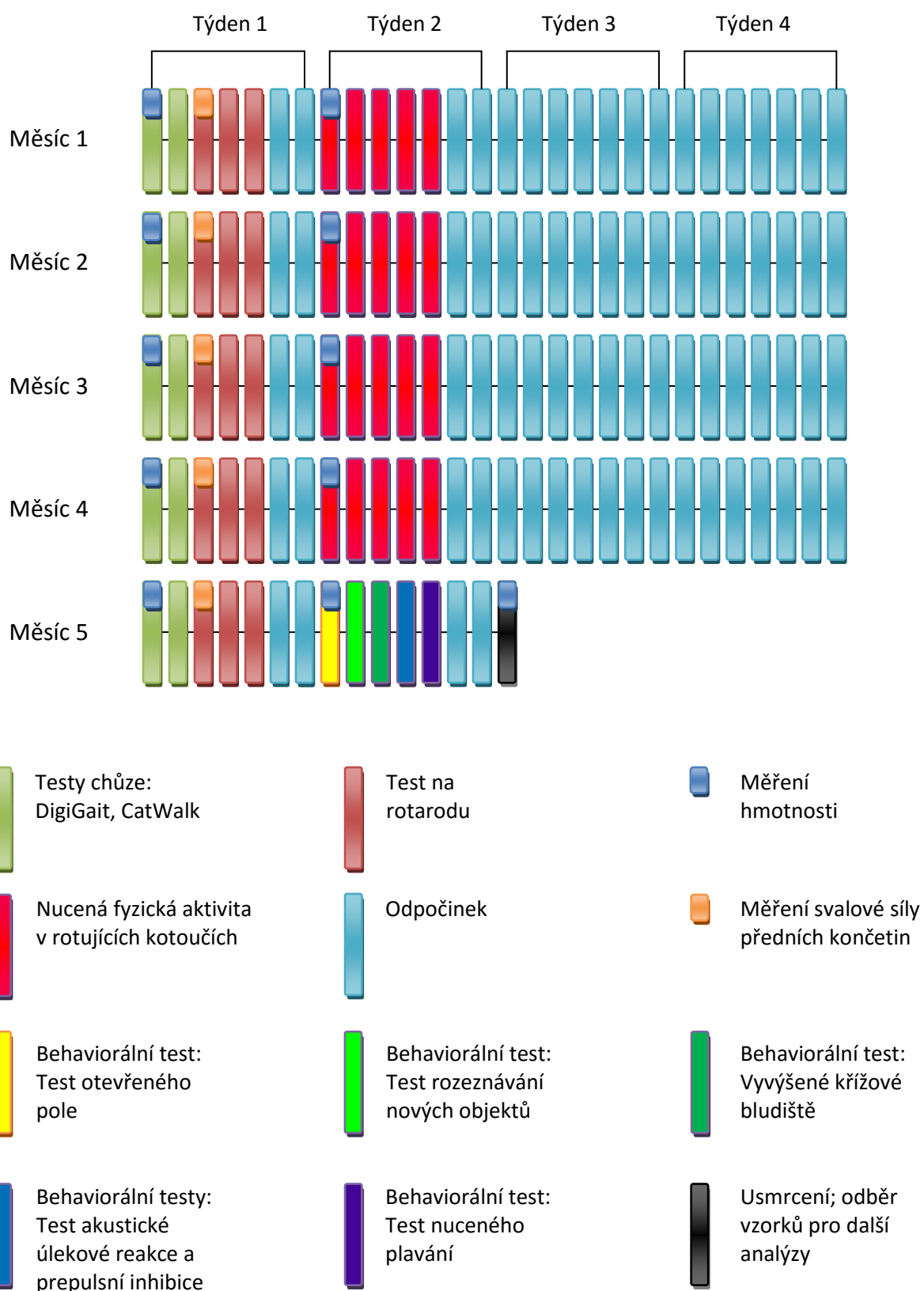
Tab. 1: Zastoupení myší v jednotlivých experimentálních skupinách.

kmen	genotyp	ovlivnění	počet samců	počet samic	celkem
B6CBA	Lc	netrénování	5	6	11
B6CBA	Lc	trénování	6	7	13
B6CBA	WT	netrénování	6	5	11
B6CBA	WT	trénování	6	5	11
B6.BR	pcd	netrénování	1	5	6
B6.BR	WT	netrénování	2	5	7

4.2. Design pokusu

Cyklus pokusů byl navržen tak, aby zahrnoval motorické testy pro posouzení motorických schopností myší s cerebelární degenerací a kvantitativní analýzu jejich chůze během ontogeneze ve srovnání se zdravými myšmi téhož kmene a zároveň pravidelný fyzický trénink (5 dní po dobu 4 měsíců) pro zhodnocení vlivu nucené fyzické aktivity na motorické projevy myší a jejich behaviorální aktivitu.

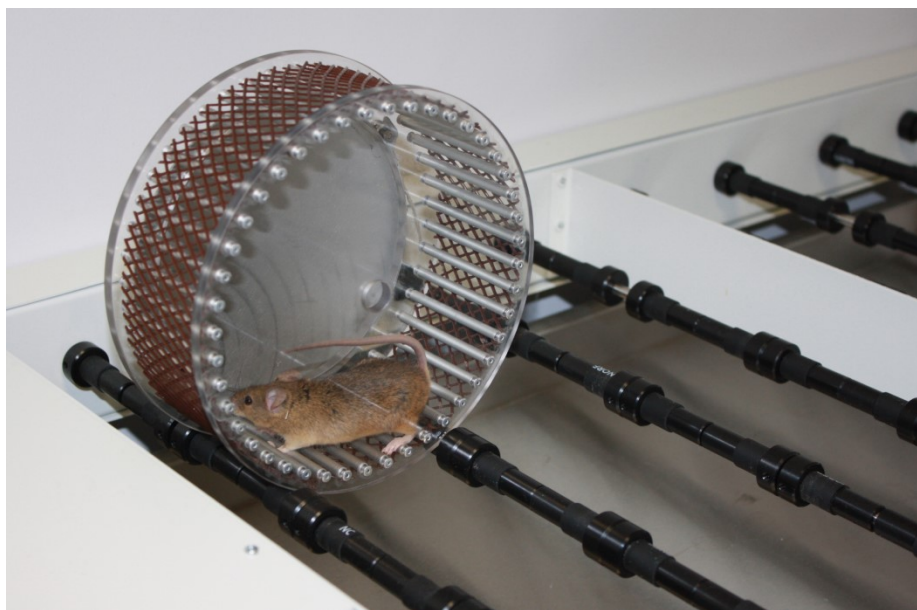
Testování probíhalo ve dvou turnusech – polovina myší byla testována v období od února do června 2016, druhá polovina od konce srpna 2016 do ledna 2017. Myši byly testovány pravidelně každý měsíc od přibližně druhého měsíce jejich věku. Testování probíhalo po dobu 5 měsíců a v závěru byly provedeny behaviorální testy, usmrcení a odběr vzorků pro další analýzy. Časové schéma pokusů je znázorněno na obrázku 2.



Obr. 2: Časové schéma experimentů.

4.3. Nucená fyzická aktivita

Nucená fyzická aktivita byla prováděna v tréninkových kotoučích zařízení The Forced Exercise / Walking Wheel System for Mice (Lafayette Instrument). Tréninkové kotouče mají vnitřní průměr 15 cm a šířku 6 cm. Jsou vyrobeny z polykarbonátu, mají velké hliníkové víko a hliníkové příčky, které slouží myším k pohodlné chůzi (obr. 3).



Obr. 3: Zařízení pro nucenou fyzickou aktivitu myší – tréninkový kotouč s myší Lurcher.

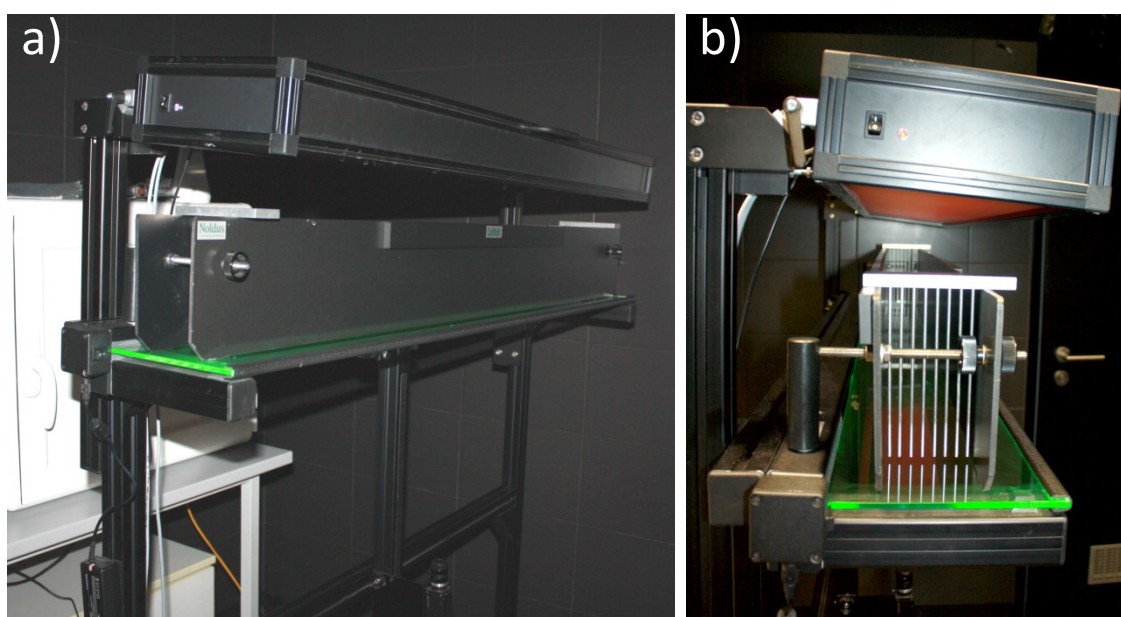
Zvířata byla fyzické aktivitě vystavována pět dní v týdnu, vždy jeden týden v měsíci. Celkový počet dnů, ve kterých byl prováděn trénink, byl 20 dní. Trénink probíhal v každém dni v pěti cyklech, intervaly mezi jednotlivými cykly byly 9 minut. Jeden cyklus obsahoval šestiminutovou fázi nucené aktivity (rychlost rotace byla nastavena na 1,7 m/min) a třiminutový odpočinek, který myši strávily v kotouči. Celkový čas strávený v kotouči byl tedy 42 minut. Tuto dobu strávily v kotouči, avšak nerotujícím, i netréované myši, aby také u nich proběhla habituace na toto prostředí a nevznikaly nežádoucí rozdíly v míře stresu nesouvisejícího se samotnou fyzickou aktivitou mezi trénovanými a netréovanými myšmi.

4.4. Vyšetření chůze

Chůzi pokusných myší jsme vyšetřovali dvěma různými přístroji, CatWalk a DigiGait.

4.4.1. CatWalk

CatWalk (Noldus Information Technology bv, Wageningen, Nizozemsko) je zařízení sloužící pro kvantifikaci spontánní chůze (obr. 4). Princip přístroje spočívá v tom, že se myš (příp. potkan) nechá volně proběhnout po skleněné desce, uvnitř které je emitované zelené LED světlo. V oblastech, kde je ploska nohy v kontaktu s deskou, se díky změně indexu lomu světla zelené světlo odrazí. Tyto osvětlené zelené plochy jsou zachyceny digitální kamerou umístěnou zespodu skleněné desky a odeslány do počítače, kde jsou příslušným softwarem otisky tlapek vizualizovány a lze je analyzovat. Nahrávání záznamů musí pro zvýraznění zelených otisků probíhat za tmy.



Obr. 4 a, b: Zařízení CatWalk.

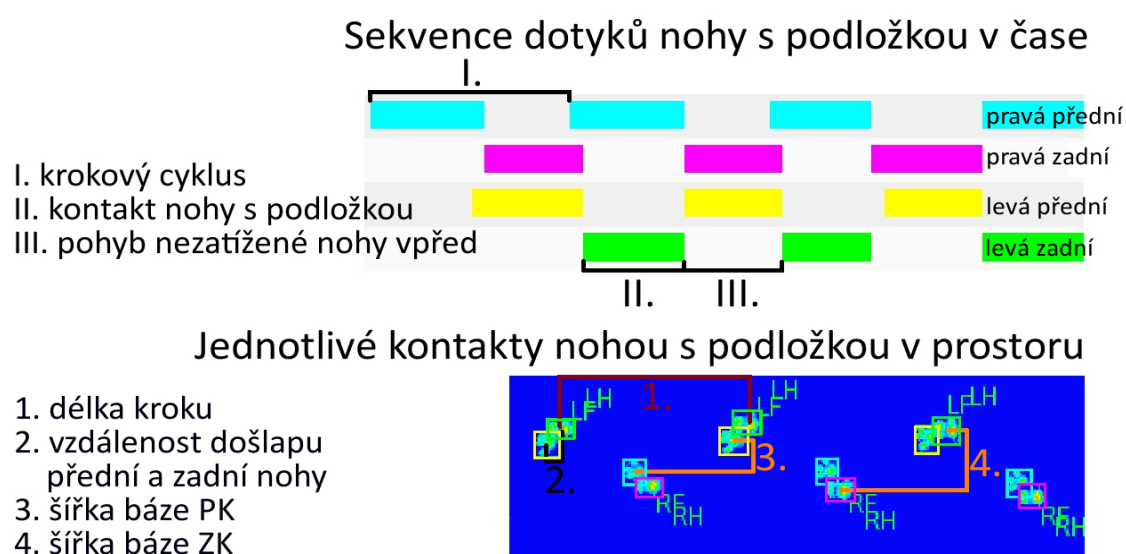
Myším byl pomocí kolmých stěn vymezen koridor o rozměrech 110 x 8,5 cm, po kterém volně běhaly, případně bylo nutné je k běhu motivovat jemným fouknutím. V zorném poli kamery pak byl úsek koridoru v délce 47 cm. Od každé myši bylo nahráno minimálně deset záznamů rovnoměrné nepřerušované chůze, z nichž bylo vybráno pět, které nejvíce vystihovaly přirozenou chůzi daného zvířete a nebyly zatíženy klasifikačními chybami. Získané hodnoty z vybraných záznamů byly zprůměrněny a použity ke statistickému zpracování.

Hodnocené parametry jsou uvedeny v tabulce 2. U parametrů rychlost přešlapu, kontakt nohy s podložkou a délka kroku a jejich variačních koeficientů byly zprůměrnovány hodnoty levých a pravých končetin, protože nelze předpokládat

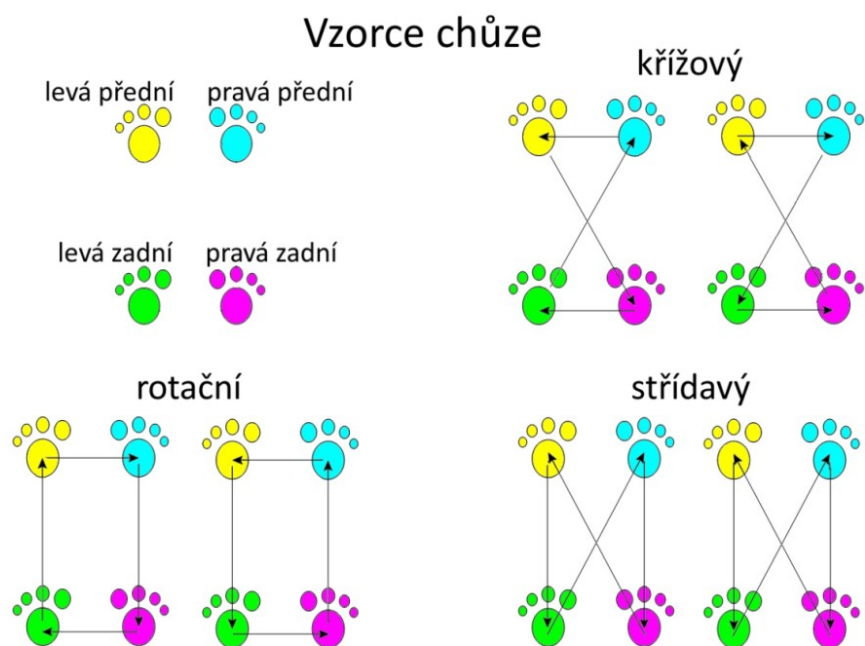
jednotnou lateralizaci poruchy. Parametry pro přední a zadní končetiny byly hodnoceny zvlášť. Vysvětlení některých parametrů chůze jsou znázorněna na obrázcích 5 - 7).

Tab. 2: Parametry chůze hodnocené přístrojem CatWalk.

Parametr česky	Původní anglický název	Jednotka
Rychlost	Speed	cm/s
Rychlost přešlapu	Swing Speed	cm/s
Rychlost přešlapu - CV	Swing Speed variation coefficient	
Kontakt nohy s podložkou	Stand	s
Kontakt nohy s podložkou - CV	Stand variation coefficient	
Délka kroku	Stride Length	cm
Délka kroku - CV	Stride Length variation coefficient	
Šířka báze	Base of Support	cm
Vzdálenost došlapu přední a zadní nohy	Print Position	cm
Vzorce chůze:		
Křížový	Step Sequence Cruciate	%
Střídavý	Step Sequence Alternate	%
Rotační	Step Sequence Rotate	%
Nepravidelná chůze	Step Sequence Irregularity Index	%
Relativní čas, kdy je v kontaktu s podložkou daná kombinace nohou:		
Bez kontaktu s podložkou	Support Zero	%
1 noha	Support Single	%
2 nohy - diagonální	Support Diagonal	%
2 nohy - laterální	Support Lateral	%
2 nohy - pletenec	Support Girdle	%
3 nohy	Support Three	%
4 nohy	Support Four	%



Obr. 5: Vysvětlení některých parametrů chůze u systému CatWalk.



Obr. 6: Vzorce chůze u myší.

Kombinace nohou v kontaktu s podložkou

1 noha



2 nohy



3 nohy



4 nohy

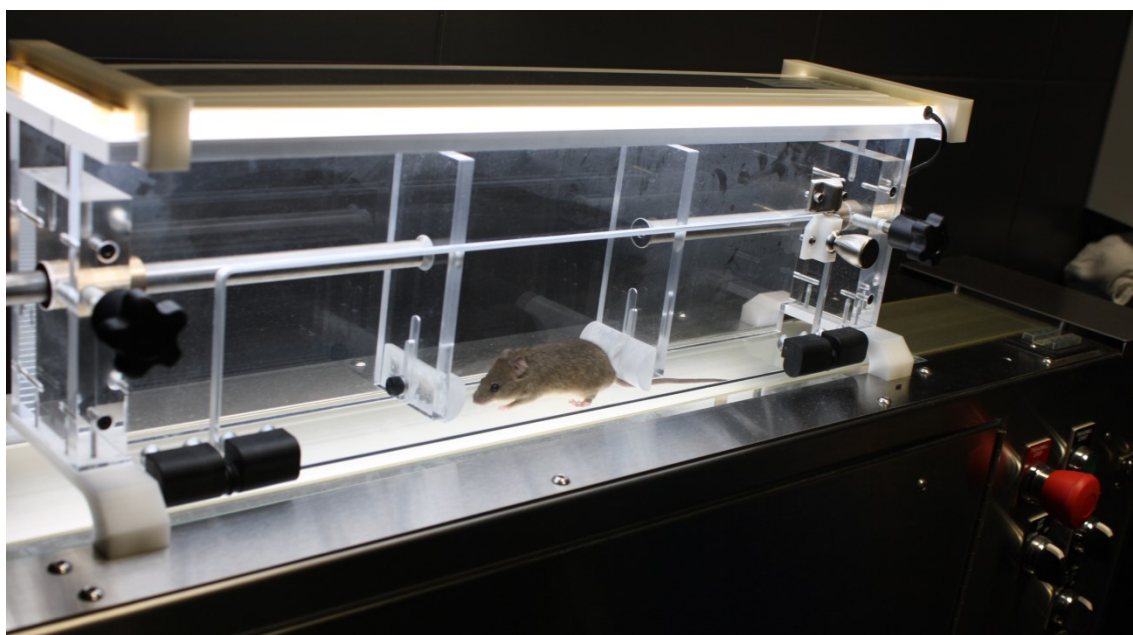


Obr. 7: Kombinace nohou, které mohou být v kontaktu s podložkou.

4.4.2. DigiGait

Přístroj DigiGait (Mouse Specifics, Inc.) byl zkonstruován pro kvantitativní stanovení chůze myší, potkanů, křečků a morčat na běžícím pásu (obr. 8). Jedná se tedy o přístroj analyzující nucenou chůzi. Využívá se toho, že testovaná zvířata se pohybují o předem definované známé rychlosti, což eliminuje rychlostní rozdíly, jako zcela zásadní faktor ovlivňující celou řadu dalších parametrů chůze. Hodnocení chůze za standardní rychlosti je hlavní předností systému DigiGait a předpokládanou výhodou oproti systému CatWalk.

Zvíře je při pohybu snímáno digitální kamerou s vysokým rozlišením umístěnou zespodu běžícího pásu a díky technologii Ventral Plane Imaging (VPI) jsou průběžně zaznamenávány obrazy tlapek z ventrálního pohledu, které jsou následně převáděny na digitální otisky. Tyto otisky jsou generované pro všechny čtyři končetiny a popisují držení těla, rozložení zatížení a kinematiku zvířat, rovnováhu a koordinaci.



Obr. 8: Myš na běžícím pásu přístroje DigiGait.

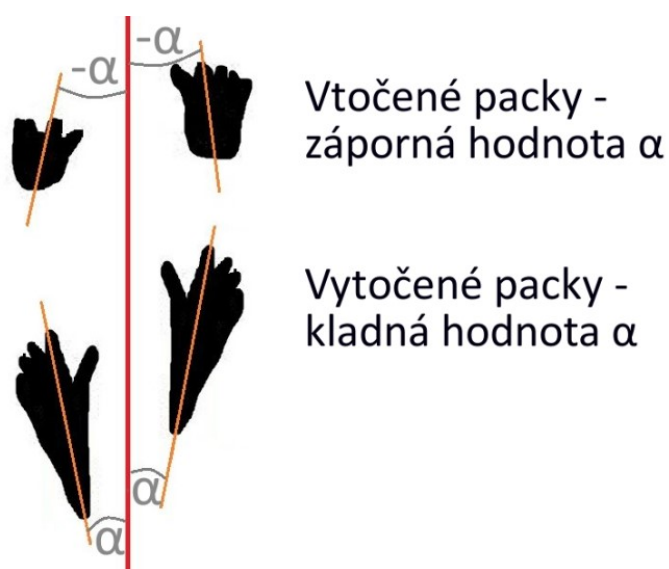
Přístroj a k němu příslušející program byl v době zahájení pokusů, které jsou předmětem této diplomové práce, na pracoviště čerstvě dodán a nebyl uveden do provozu. Součástí práce tedy bylo jeho zprovoznění a optimalizace protokolu testování ve smyslu určení optimální rychlosti pohybu pásu, která by vyhovovala zdravým myším i myším s těžkou mozečkovou ataxií, nastavení kamery, volba optimální velikosti komory, v níž se zvíře pohybuje a standardizace postupu analýzy jednotlivých záznamů.

Rovněž bylo potřeba rozpoznat možné artefakty částečně automatizované analýzy, vypracovat postup jejich identifikace a korekce a stanovit kritéria pro eliminaci záznamů, jejichž korekci software neumožňuje, a pro další zpracování zvolit parametry, které jsou přístrojem měřeny s přijatelnou spolehlivostí. Na zkušebních myších byla zjištěna vhodná rychlost pásu 10 cm/s.

Z důvodu náročnosti nahrávání záznamů a nemožnosti manuální opravy automaticky chybně detekovaných tlapek byl do této práce zahrnut zúžený výběr dat. Byla použita pouze data, která nebyla (nebo byla pouze minimálně) chybami analyzačního softwaru ovlivněna. Hodnocené parametry jsou uvedeny v tabulce 3. Parametr úhel nohy je vysvětlen na obrázku 9.

Tab. 3: Parametry chůze hodnocené přístrojem DigiGait.

Parametr český	Původní anglický název	Jednotka
Rychlost přešlapu	Swing Speed	cm/s
Kontakt nohy s podložkou	Stance	s
Délka kroku	Stride Length	cm
Délka kroku - CV	Stride Length CV	
Úhel nohy	Paw Angle	°
Variabilita úhlu nohy	Paw Angle Variability	
Šířka báze	Stance Width	cm
Šířka báze - CV	Stance Width CV	



Obr. 9: Vysvětlení parametru úhel nohy (α).

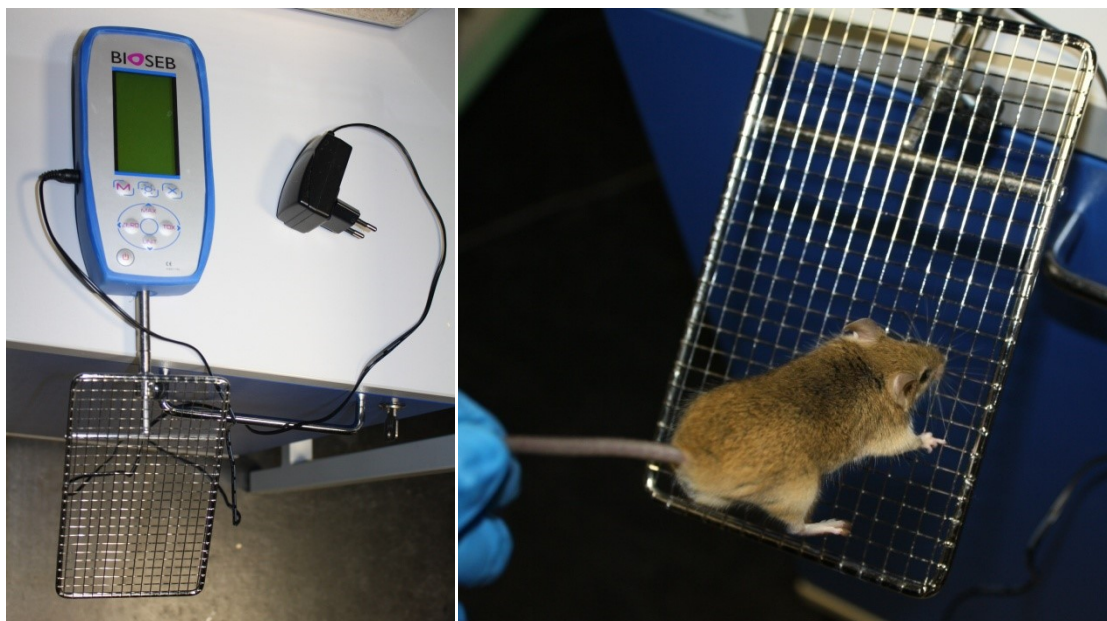
4.5. Rotarod

Vyšetření schopnosti motorické koordinace bylo provedeno pomocí rotarodu, který patří k nejvyužívanějším klasickým metodám hodnocení motorických funkcí u laboratorních hlodavců. Vyšetření na rotarodu slouží pro klasifikaci motorické koordinace a schopnosti motorického učení. Jedná se o rotující válec umístěný ve výšce. Na vrchol válce je posazeno zvíře, jehož úkolem je udržet se na válci co nejdéle. Měřena je doba, po kterou je zvíře schopno udržet se, tzv. latence pádu.

Rotarod na pracovišti Ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni je rozdělen na čtyři boxy, nabízí tedy možnost testovat čtyři myši najednou, kdy má každá myš vymezený svůj prostor. Průměr válce je 4 cm, délka segmentu válce v jednom boxu je 8,5 cm. Povrch válce tvoří drsná protiskluzová guma. Protokol rotarodu byl nastaven na plynulé zrychlování rotace válce z 0 na 60 otáček za minutu během 6 minut. V případě, že bylo tohoto času dosaženo, test byl ukončen s maximální latencí (tedy 360 s). V případě, že myš spadla dříve, čas byl automaticky odečten a myš byla navrácena do své klece. Testování probíhalo ve čtyřech cyklech. Intervaly mezi jednotlivými cykly byly 16 minut. Dobu odpočinku mezi cykly strávily myši ve svých ubikacích. Během jednoho testovacího dne byly takto získány čtyři hodnoty latence pádu každé myši, pro další zpracování pak byly použity průměrné hodnoty.

4.6. Test svalové síly (Grip strength test)

Pro změření svalové síly myši byl použit Grip Strength test (Bioseb). Umožňuje objektivně kvantifikovat svalovou sílu a posoudit např. účinek léků, toxinů, neurodegenerativních onemocnění nebo onemocnění svalů. Přístroj se často používá v kombinaci s rotarodem. Siloměr je vybaven speciálně navrženou kovovou mřížkou, na kterou jsou předníma nohama zavěšena testovaná zvířata (obr. 10). Táhnutím za ocas ve vodorovné rovině se mřížka napíná a těsně před tím, než se zvíře mřížky pustí, je zaznamenána působící síla v newtonech. Měření bylo prováděno vždy čtyřikrát pro každou myš a byla vypočtena průměrná hodnota síly.



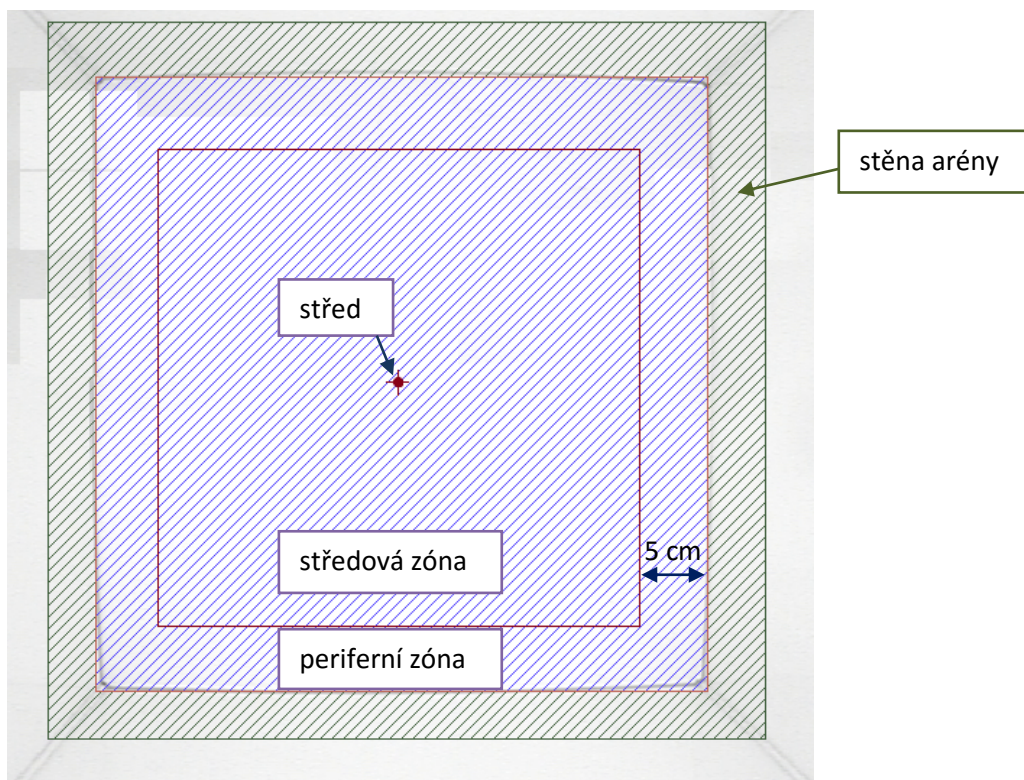
Obr. 10: Přístroj pro měření svalové síly u laboratorních hlodavců.

4.7. Behaviorální testy

4.7.1. Test v otevřeném poli (Open field test - OFT)

Test v otevřeném poli je jedním z tradičně uznávaných behaviorálních testů, sloužících ke stanovení emocionality zvířat. Zvíře umístěné do neznámého prostředí se musí vypořádat s konfliktem mezi tendencí aktivně prozkoumávat nové prostředí a zvýšit svou lokomoční aktivitu a orientační chování (panáčkování, čichání) a strachem z otevřených prostor, který se projeví tigmotaxí, tedy preferencí okraje arény. Pomocí tohoto testu lze studovat úroveň spontánní motorické aktivity, explorační prostředí a chování souvisejícího s anxiétou.

K testování byla použita bílá plastová aréna čtvercového půdorysu o rozměrech 50 x 50 cm a výšce stěn též 50 cm. Aréna byla osvětlena rozptýleným světlem (250 - 300 lux). Myš byla vložena do středu arény a po dobu 8 minut byla ponechána volně se pohybovat po aréně. Její pohyb byl snímán sledovacím systémem EthoVision XT 7.1 (Noldus). Digitální kamera byla umístěna nad arénou. Pomocí programu EthoVision XT byla plocha arény rozdělena na virtuální centrální zónu a okrajové části (šířka 5 cm) při stěnách (obr. 11). Sledována byla pak délka trajektorie myši, průměrná vzdálenost myši od středu arény a relativní dráha a relativní čas strávený v periferní zóně arény.



Obr. 11: Aréna testu v otevřeném poli rozdělená na středovou a periferní zónu.

4.7.2. Test rozeznávání nových objektů (Novel object recognition test - NORT)

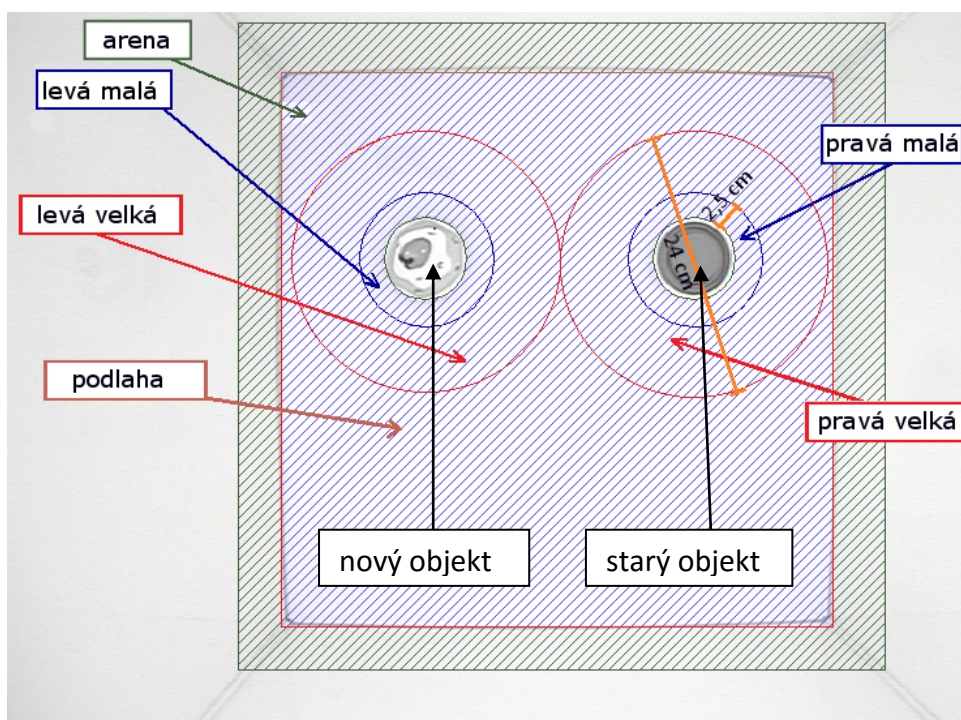
Tento test je zaměřený na zkoumání paměti zvířat a schopnosti rozpoznat nový objekt od známého. Princip je velmi jednoduchý a je založen na přirozené tendenci zvířete věnovat více pozornosti novému neznámému předmětu. Test se provádí v téže aréně jako test v otevřeném poli, kam se nejdříve vloží dva identické objekty, které může zvíře libovolně prozkoumávat. Po určité době je jeden z předmětů nahrazen novým a porovnává se, jaký čas zvíře tráví prozkoumáváním nového a starého objektu. Při normální funkci paměti bude zvíře vykazovat větší zájem o nový objekt.

Test byl prováděn v téže aréně jako při testu v otevřeném poli. V první fázi testování byly použity dva identické předměty, jednalo se o lahvičky na vodu s připevněnou nálevkou pro zamezení vyskakování myši na objekt. Umístění předmětů je znázorněno na obrázku 12. Myš byla vložena do středu arény ve stejné vzdálenosti k oběma předmětům. Záznam její aktivity probíhal po dobu 4 minut. Poté následovala 10 minutová přestávka, kterou myš strávila ve své kleci. Během přestávky byly objekty řádně omyty 70% etanolem a jeden z objektů byl vyměněn za plastový dortíček

podobných rozměrů. Druhá fáze testování trvala také 4 minuty. Pohyb myši byl zaznamenáván automatickým sledovacím systémem EthoVision XT 7.1, který umožnil identifikaci tří bodů těla myši – čenichu, středu myši a základny ocasu. Při posouzení totiž nejde jen o to, že se zvíře vyskytuje v definované zóně v blízkosti předmětu, ale především, zda je zvíře k předmětu nasměřováno hlavou.

V aréně byly definovány následující virtuální zóny: levá a pravá malá kruhová zóna tvořila kolem předmětu lem o šířce 2,5 cm. Velké kruhové zóny (levá a pravá), soustředné s předmětem a malou zónou, měly průměr 24 cm. Tyto velké zóny se mezi předměty navzájem dotýkaly a od nejbližších stěn arény byly vzdálené 0,5 cm (obr. 12).

Hodnoceny byly tyto parametry: délka trajektorie myši, průměrná vzdálenost k novému, resp. známému objektu, čas, kdy se myš vyskytovala v příslušných zónách a zároveň byla orientována hlavou směrem k novému, resp. známému objektu, a čas strávený v definovaných zónách.



Obr. 12: Definované zóny a umístění předmětů v testu rozeznávání nových objektů.

4.7.3. Vyvýšené křížové bludiště (Elevated plus maze - EPM)

Vyvýšené křížové bludiště je jedním ze standardně používaných behaviorálních testů pro zkoumání anxiety. Dvě protilehlá ramena kříže jsou opatřena stěnami, zatímco zbylá dvě ramena jsou ponechána volná. Test je založen na konfliktu mezi

tendencí explorovat nové prostředí a strachem z otevřených vyvýšených a intenzivně osvětlených prostor (Lister, 1987; Bourin et al., 2007).

Použité křížové bludiště mělo délku jednoho ramene 35 cm a šířku 5 cm. Osvětlení otevřených ramen bludiště mělo intenzitu 670 – 680 lux. Myš byla vložena do středu kříže a následně byla ponechána volně se pohybovat po bludišti. Pohyb byl opět sledován kamerou umístěnou nad bludištěm a získané nahrávky byly dále zpracovány systémem EthoVision XT 7.1. Nahrávání trvalo 8 minut. V případě pádu myši z plošiny byla myš ihned vrácena na střed bludiště, nahrávání zastaveno nebylo. Ve výsledku však záznamy myší, které z plošiny spadly, nebyly zařazeny do statistického zpracování. Sledována byla celková dráha, kterou myš ušla, relativní doba strávená v uzavřených, resp. otevřených ramenech a počet vstupů do uzavřených, resp. otevřených ramen. Delší doba strávená v otevřených ramenech se považuje za ukazatele nižší míry anxiety (Walf & Frye, 2007).

4.7.4. Akustická úleková reakce a prepulsní inhibice (Acoustic startle response + prepulse inhibition - ASR + PPI):

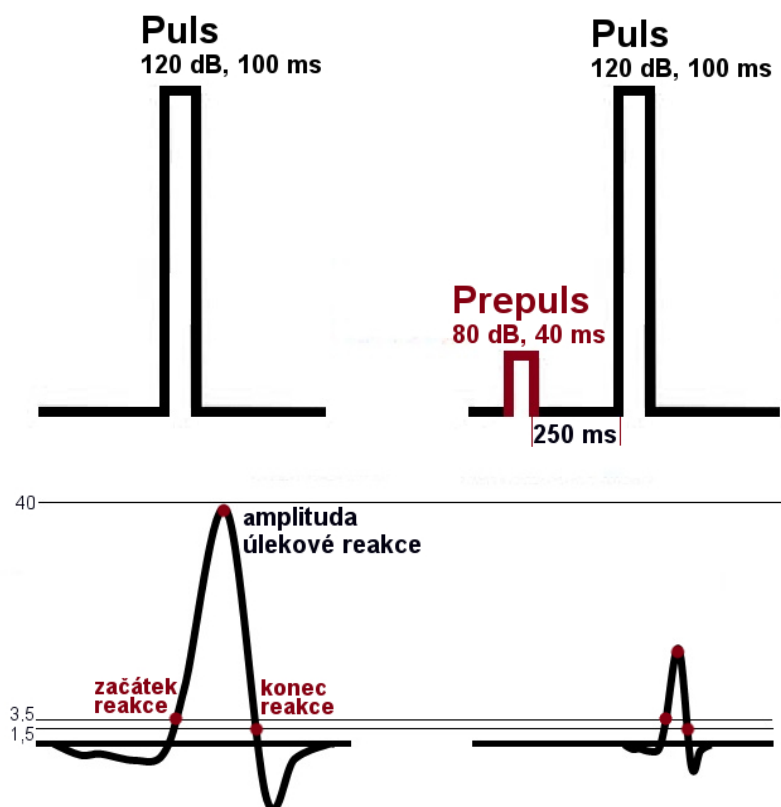
Zařízení Startle and Fear Combined System (Panlab) měří reakce hlodavců na hlasitý a neočekávaný zvukový stimul. Zvíře je umístěno do zvukotěsného boxu a vystaveno náhlému hlasitému zvukovému stimulu. Úleková reakce, vyvolaná tímto stimulem je přirozeným reflexem, avšak odpověď není vždy stereotypní. Může být upravována vlivem emocí, jako je strach nebo radost, habituací nebo senzitivací. Měří se intenzita úlekové reakce na zvukový stimul. Pro zamezení nežádoucího volného pohybu zvířete po boxu je nutné myši vložit do těsné kapsle připevněné k podložce, jejíž pohyb vyvolaný odrazem myši při úleku je přenášen na akcelerometry přístroje.

Prepulsní inhibice je neurologický jev, kdy předcházející slabší stimul inhibuje reakci organismu na následný hlasitý stimul (obr. 13). Snížení amplitudy úlekové reakce odráží schopnost nervového systému dočasně se přizpůsobit silným smyslovým podnětům, kterým předchází slabší varovný signál. Deficity v prepulsní inhibici obecně hovoří o narušení nějakého specifického obvodu mozku a byly nalezeny a dobře popsány zejména u pacientů trpících schizofrenií (Swerdlow et al., 2008).

Protokol experimentu byl nastaven následujícím způsobem: habituace probíhala po dobu 300 sekund, myš byla vystavena pouze tzv. bílému šumu o hladině

intenzity 60 dB. Následující zvukové stimuly a intervaly mezi nimi byly vysílány v pseudonáhodných sekvencích. Celkem bylo vysláno 48 samostatných zvukových podnětů o frekvenci 10 000 Hz, hladině intenzity 120 dB a délce trvání 100 ms a 24 zvukových podnětů stejných parametrů, jimž předcházel prepuls s frekvencí 10 000 Hz, hladinou intenzity 80 dB a dobou trvání 40 ms. Mezi prepulsem a vlastním zvukovým stimulem byl interval 250 ms. Jednotlivé zvukové stimuly byly odděleny pauzami o délce 4, 6, 8 nebo 10 sekund. Každá délka pauzy byla použita 18 x (12 x před samostatným zvukovým podnětem, 6 x před prepulsem). Jako reakce na stimul byla hodnocena pouze odpověď, která byla zaznamenána v intervalu do 400 ms po zvukovém stimulu. Celková doba trvání experimentu byla 817,2 sekund. Přesné schéma za sebou jdoucích podnětů a pauz je uvedeno v tabulce 4.

Vyhodnocovány byly tři parametry akustické úlekové reakce: amplituda, plocha pod křivkou a latence do vrcholu křivky. Amplituda reakce je relativní veličina, přičemž vrchol rozsahu detekce odpovědi byl označen číslem 100. Dále byla hodnocena míra prepulsní inhibice jako procento neinhibované reakce, na které klesne reakce na podnět kombinovaný s prepulsem.



Obr. 13: Zobrazení reakce na zvukový impuls bez prepulsu a s prepulsem. Za začátek reakce bylo považováno překročení prahu 3,5. Konec reakce značil pokles pod prahovou hodnotu 1,5.

Tab. 4: Nastavení protokolu pro měření akustické úlekové reakce a prepulsní inhibice.

START	čas (s)				
habituační	300	samostatný podnět	474,55	pauza 10 s	652,65
samostatný podnět	300,4	pauza 8 s	482,25	samostatný podnět	653,05
pauza 10 s	310,1	prepuls	482,5	pauza 6 s	658,75
samostatný podnět	310,5	podnět po prepulsu	482,9	prepuls	659
pauza 8 s	318,2	pauza 8 s	490,6	podnět po prepulsu	659,4
samostatný podnět	318,6	samostatný podnět	491	pauza 8 s	667,1
pauza 4 s	322,3	pauza 10 s	500,7	samostatný podnět	667,5
samostatný podnět	322,7	samostatný podnět	501,1	pauza 4 s	671,2
pauza 6 s	328,4	pauza 4 s	504,8	samostatný podnět	671,6
prepuls	328,65	prepuls	505,05	pauza 6 s	677,3
podnět po prepulsu	329,05	podnět po prepulsu	505,45	samostatný podnět	677,7
pauza 6 s	334,75	pauza 6 s	511,15	pauza 10 s	687,4
samostatný podnět	335,15	samostatný podnět	511,55	prepuls	687,65
pauza 4 s	338,85	pauza 8 s	519,25	podnět po prepulsu	688,05
samostatný podnět	339,25	samostatný podnět	519,65	pauza 10 s	697,75
pauza 8 s	346,95	pauza 10 s	529,35	prepuls	698
samostatný podnět	347,35	samostatný podnět	529,75	podnět po prepulsu	698,4
pauza 6 s	353,05	pauza 10 s	539,45	pauza 8 s	706,1
samostatný podnět	353,45	prepuls	539,7	samostatný podnět	706,5
pauza 10 s	363,15	podnět po prepulsu	540,1	pauza 6 s	712,2
prepuls	363,4	pauza 4 s	543,8	samostatný podnět	712,6
podnět po prepulsu	363,8	samostatný podnět	544,2	pauza 4 s	716,3
pauza 4 s	367,5	pauza 8 s	551,9	prepuls	716,55
samostatný podnět	367,9	samostatný podnět	552,3	podnět po prepulsu	716,95
pauza 10 s	377,6	pauza 4 s	556	pauza 6 s	722,65
samostatný podnět	378	prepuls	556,25	samostatný podnět	723,05
pauza 8 s	385,7	podnět po prepulsu	556,65	pauza 8 s	730,75
samostatný podnět	386,1	pauza 6 s	562,35	prepuls	731
pauza 4 s	389,8	samostatný podnět	562,75	podnět po prepulsu	731,4
prepuls	390,05	pauza 10 s	572,45	pauza 10 s	741,1
podnět po prepulsu	390,45	prepuls	572,7	samostatný podnět	741,5
pauza 10 s	400,15	podnět po prepulsu	573,1	pauza 6 s	747,2
samostatný podnět	400,55	pauza 6 s	578,8	prepuls	747,45
pauza 6 s	406,25	samostatný podnět	579,2	podnět po prepulsu	747,85
samostatný podnět	406,65	pauza 6 s	584,9	pauza 4 s	751,55
pauza 6 s	412,35	samostatný podnět	585,3	samostatný podnět	751,95
samostatný podnět	412,75	pauza 8 s	593	pauza 6 s	757,65
pauza 4 s	416,45	samostatný podnět	593,4	samostatný podnět	758,05
prepuls	416,7	pauza 4 s	597,1	pauza 10 s	767,75
podnět po prepulsu	417,1	prepuls	597,35	prepuls	768
pauza 10 s	426,8	podnět po prepulsu	597,75	podnět po prepulsu	768,4
prepuls	427,05	pauza 8 s	605,45	pauza 8 s	776,1
podnět po prepulsu	427,45	samostatný podnět	605,85	samostatný podnět	776,5
pauza 8 s	435,15	pauza 6 s	611,55	pauza 4 s	780,2
samostatný podnět	435,55	prepuls	611,8	prepuls	780,45
pauza 8 s	443,25	podnět po prepulsu	612,2	podnět po prepulsu	780,85
samostatný podnět	443,65	pauza 4 s	615,9	pauza 6 s	786,55
pauza 10 s	453,35	samostatný podnět	616,3	samostatný podnět	786,95
prepuls	453,6	pauza 10 s	626	pauza 4 s	790,65
podnět po prepulsu	454	samostatný podnět	626,4	samostatný podnět	791,05
pauza 10 s	463,7	pauza 4 s	630,1	pauza 8 s	798,75
samostatný podnět	464,1	samostatný podnět	630,5	prepuls	799
pauza 6 s	469,8	pauza 8 s	638,2	podnět po prepulsu	799,4
prepuls	470,05	prepuls	638,45	pauza 10 s	809,1
podnět po prepulsu	470,45	podnět po prepulsu	638,85	samostatný podnět	809,5
pauza 4 s	474,15	pauza 4 s	642,55	pauza 8 s	817,2
		samostatný podnět	642,95	END	817,2

4.7.5. Test nuceného plavání (Forced swimming test - FST)

Test nuceného plavání je příkladem animálního modelu naučené bezmocnosti (learned hopelessness). Tento model poprvé popsali Porsolt (Porsolt et al., 1977) a používán je především pro stanovení míry deprese u zvířat, přičemž platí, že jedinci s větší mírou deprese jsou v jistém smyslu ve výhodě oproti těm méně depresivním. Depresivní chování (označováno jako depressive-like behaviour) totiž může zvýšit schopnost jedince vyrovnat se s ohrožujícími situacemi tím, že zvíře včas zaujme polohu, která co nejvíce šetří energii (zvíře je v nehybném stavu, splývá), zatímco méně depresivní jedinec se až do poslední chvíle snaží z nepříjemné situace vymanit a věnuje tomu zcela zbytečně příliš úsilí.

Jako aparatura pro tento test sloužila skleněná válcová nádoba o objemu 5 000 ml, do které bylo napuštěno 3 000 ml vody o teplotě 26 - 28 °C. Voda dosahovala asi 10 cm pod okraj kádinky, aby se myš do ní vložená nemohla dostat ven. Nad kádinkou byla umístěna kamera, která zachycovala počínání myši.

Pomocí softwaru EthoVision XT 7.1 pak byla vyhodnocována relativní nepohyblivost v časových úsecích 0 - 4 minuty, 4 - 8 minut a 0 - 8 minut.

4.8. Odběr vzorků

Tři dny po skončení behaviorálních testů byly myši usmrceny cervikální dislokací. Byly jim odebrány mozky a vzorky krevního séra pro další analýzy, které nejsou součástí této práce. Pro účely této práce byly odebrány nadledviny, řádně očištěny od tukové tkáně a byla změřena jejich hmotnost.

4.9. Metodika statistických analýz

Všechny statistické analýzy a jejich vizualizace byly provedeny v programu R (R Development Core Team, 2017). Pro statistické analýzy byly použity permutační testy. Jednoduchá porovnání skupin byla provedena permutačním ANOVA testem (5 000 permutací) pomocí R balíčku *predictmeans* (Luo et al., 2014). Porovnání skupin s opakovanými měřeními byla provedena pomocí permutačních zobecněných

nejmenších čtverců (*generalized least square models - GLS*) s *Compound symmetry* korelační strukturou reziduálů, a to pomocí *R* balíčku *nlme* (Pinheiro et al., 2014).

U každé analýzy byly provedeny dvě verze analýz: jedna bez použití varianční funkce a druhá s využitím *varPower* varianční funkce. Obě analýzy pak byly porovnány z hlediska Akaikeho informačního kritéria – AIC (Burnham & Anderson, 2003), vybrán a permutován byl pak „úspornější“ model s nižším AIC. Post-hoc testy byly po jednoduchých porovnáních i analýzách opakovaných měřeních provedeny pomocí permutačních t-testů (Monte-Carlo permutační test s 10 000 permutacemi) s navazující BH (Benjamini-Hochberg) korekcí pro mnohočetná porovnání (Benjamini & Hochberg, 1995). Post-hoc testy byly hodnoceny rozdíly mezi skupinami uvedenými v tabulce 5.

Tab. 5: Skupiny porovnávané post-hoc testy a požadovaná zjištění.

Porovnávané skupiny			Požadované zjištění
B6CBA Lurcher netrénované	vs.	B6CBA WT netrénované	vliv mutace <i>Grid2^{Lc}</i>
B6.BR pcd netrénované	vs.	B6.BR WT netrénované	vliv mutace <i>Agtpbp1^{pcd}</i>
B6CBA Lurcher netrénované	vs.	B6.BR pcd netrénované	rozdíl mezi mutanty Lc a pcd
B6CBA WT netrénované	vs.	B6.BR WT netrénované	rozdíly kmenů B6CBA a B6.BR
B6CBA Lurcher netrénované	vs.	B6CBA Lurcher trénované	vliv tréninku u myši Lc
B6CBA WT netrénované	vs.	B6CBA WT trénované	vliv tréninku u WT B6CBA

Pro zhodnocení vlivu ontogeneze byla tato porovnání provedena zvlášť v jednotlivých experimentálních měsících. Dále pak byly porovnávány rozdíly mezi prvním a pátým měsícem experimentu u daných skupin myši. V případě testu na rotarodu byly porovnávány třetí dny prvního a pátého měsíce pro zhodnocení vlivu ontogeneze a navíc byly porovnávány první vs. třetí dny v každém měsíci pro zhodnocení schopnosti motorického učení. Jelikož některé behaviorální a motorické testy podstoupily v dostatečně početném vzorku jen myši kmene B6CBA, počet porovnání byl v těchto případech omezen.

Pro porovnání časového vývoje některých hodnocených proměnných (latence pádu na rotarodu, svalová síla) během 5 měsíců byla provedena jednoduchá permutační ANOVA porovnávající individuální trendy.

Pro posouzení míry vzájemných korelací parametrů získaných analýzou chůze systémem CatWalk byla vytvořena matice Spearmanových korelačních koeficientů

(příloha 1, 2), která byla vizualizována pomocí balíčku *corrplot* (Wei, 2012). Korelace byly vypočteny uvnitř skupin myší Lurcher a wild kmene B6CBA. Výsledek korelační analýzy ukázal, že zejména faktory jako kontakt nohy s podložkou, délka kroku a rychlost přešlapu byly silně korelovány s rychlostí. Tento výsledek byl poté využit pro selekci hodnocených parametrů při analýze chůze během ontogeneze, kde byly upřednostněny variační koeficienty těchto proměnných, namísto jejich absolutních hodnot.

V testu rozeznávání nových objektů byly hodnoceny relativní parametry, které vznikly podílem hodnot vztažených k novému objektu (NO) vzhledem k součtu hodnot vztažených k novému (NO) a starému (SO) objektu.

Např.

$$\text{Relativní vzdálenost k NO (\%)} = \frac{\text{Vzdálenost k NO (cm)}}{\text{Vzdálenost k NO (cm)} + \text{Vzdálenost k SO (cm)}} \times 100$$

U testu prepulsní inhibice byly vytvořeny parametry relativní amplituda inhibované reakce, relativní plocha pod křivkou inhibované reakce a relativní latence do vrcholu křivky u inhibované reakce. Tyto parametry uvádějí procento neinhibované reakce, na které klesne reakce na podnět kombinovaný s prepulsem.

$$\text{Relativní amplituda inhibované reakce (PPI)} = \frac{\text{Amplituda inhibované reakce (PPI)}}{\text{Amplituda úlekové reakce (ASR)}} \times 100$$

$$\text{Relativní plocha pod křivkou (PPI)} = \frac{\text{Plocha pod křivkou (PPI)}}{\text{Plocha pod křivkou (ASR)}} \times 100$$

$$\text{Relativní latence do vrcholu křivky (PPI)} = \frac{\text{Latence do vrcholu křivky (PPI)}}{\text{Latence do vrcholu křivky (ASR)}} \times 100$$

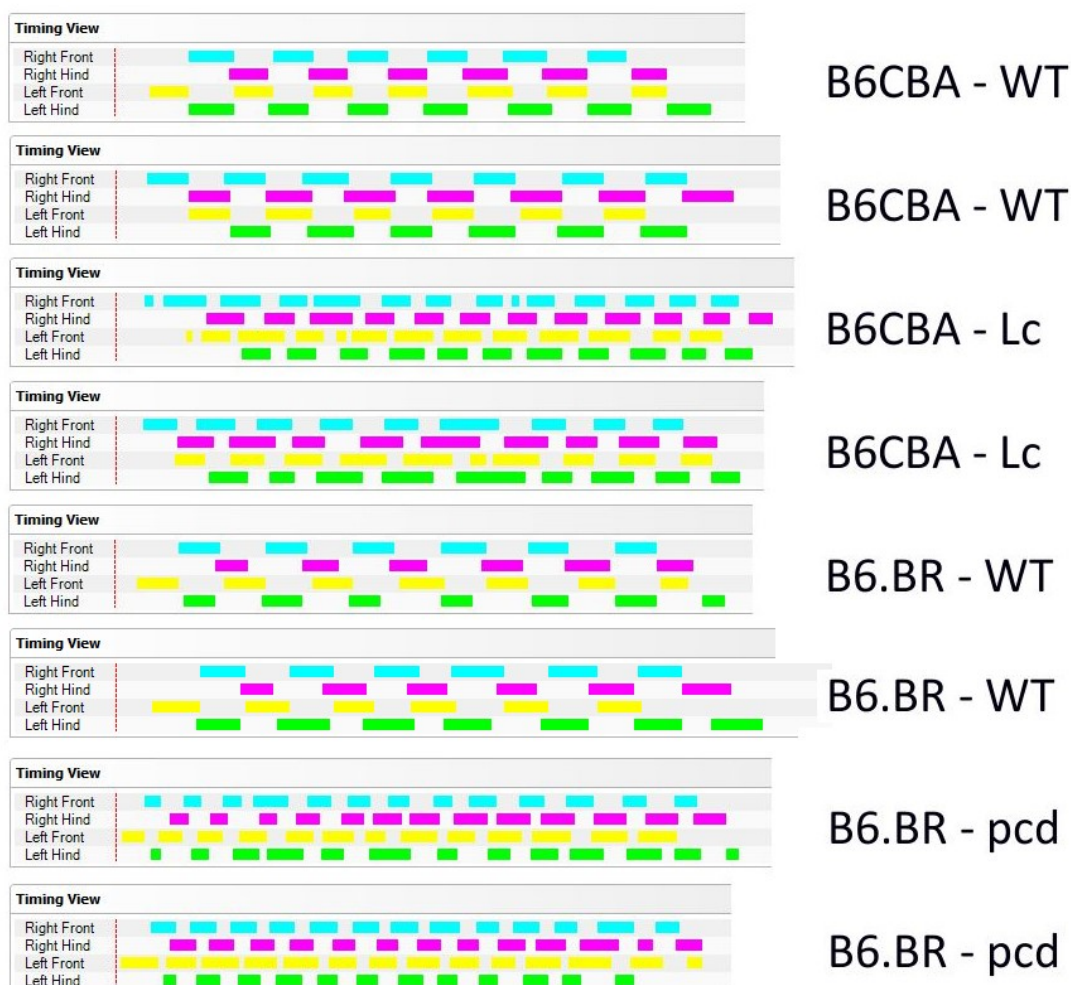
Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty za experimentální skupinu. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. Za statisticky významné byly považovány rozdíly, pro které platí * $p < 0,05$; ** $p = 0,01 - 0,001$; *** $p < 0,001$.

5. VÝSLEDKY

5.1. Motorické funkce v průběhu ontogeneze

5.1.1. Kvantitativní analýza chůze pomocí systému CatWalk

Ilustrativní záznamy časového průběhu chůze myší jednotlivých skupin jsou znázorněny na obr. 14.



Obr. 14: Vybrané záznamy chůze typické pro dané skupiny myší. Nápadná je nepravidelnost kroku a kratší doba pohybu končetiny vpřed u mutantních myší.

K hodnocení vlivu ontogeneze byla z důvodu časové náročnosti analýz u testů pro kvantifikaci chůze použita pouze data ze zhruba poloviny testovaných myší. Pro nedostatečný počet myší kmene B6.BR nebyly do hodnocení zahrnuty myši pcd ani jejich zdravé kontroly. Počty použitých zvířat, převážně samců, jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 6):

Tab. 6: Počty zvířat použitých ke kvantitativní analýze chůze systémem CatWalk v průběhu ontogeneze.

kmen	genotyp	ovlivnění	počet myší
B6CBA	Lc	netrénování	5
B6CBA	Lc	trénování	5
B6CBA	WT	netrénování	6
B6CBA	WT	trénování	9

Pro snížení počtu hodnocených kontrastů jednotlivých proměnných a tedy redukci možnosti výskytu chyby 1. druhu bylo pro posouzení ontogenetického vývoje chůze zvoleno zúžené spektrum parametrů. Byla hodnocena rychlost chůze myši a následně parametry, které nejsou na rychlosti chůze závislé. Výsledky GLS modelu jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab 7: Výsledky GLS modelu popisujícího vliv jednotlivých faktorů a jejich interakcí na parametry chůze zkoumané systémem CatWalk z hlediska ontogeneze. Statistická signifikance (p) je založena na permutačním testu původního modelu. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

PK - Kontakt nohy s podložkou - CV				ZK - Kontakt nohy s podložkou - CV			
faktor	D.F.	F	p	faktor	D.F.	F	p
skupina	3	16,8205	0,0008	skupina	3	31,9725	0,0003
měsíc	4	2,1006	0,0038	měsíc	4	1,5246	0,0795
skupina : měsíc	12	2,0149	0,0008	skupina : měsíc	12	1,8057	0,0143
PK - Rychlost přešlapu - CV				ZK - Rychlost přešlapu - CV			
faktor	D.F.	F	p	faktor	D.F.	F	p
skupina	3	41,4436	0,0005	skupina	3	49,8671	0,0005
měsíc	4	3,4472	0,0005	měsíc	4	0,3402	0,6984
skupina : měsíc	12	1,9980	0,0005	skupina : měsíc	12	0,9550	0,3683
PK - Délka kroku – CV				ZK - Délka kroku - CV			
faktor	D.F.	F	p	faktor	D.F.	F	p
skupina	3	23,7914	0,0018	skupina	3	59,8292	0,0003
měsíc	4	3,0310	0,0018	měsíc	4	2,9502	0,0019
skupina : měsíc	12	1,5848	0,0053	skupina : měsíc	12	1,4777	0,0378
Šířka báze PK				Šířka báze ZK			
faktor	D.F.	F	p	faktor	D.F.	F	p
skupina	3	9,5837	0,0004	skupina	3	2,2326	0,0898
měsíc	4	3,7379	0,0074	měsíc	4	12,5773	0,0002
skupina : měsíc	12	1,7672	0,0688	skupina : měsíc	12	1,1474	0,3349

Rychlost				Vzdálenost došlapu PK a ZK			
faktor	D.F.	F	p	faktor	D.F.	F	p
skupina	3	49,9242	0,0002	skupina	3	5,3044	0,0046
měsíc	4	1,9140	0,1162	měsíc	4	7,4146	0,0002
skupina : měsíc	12	0,7787	0,6643	skupina : měsíc	12	0,5786	0,8609

Relativní čas, kdy jsou v kontaktu s podložkou 2 nohy v laterální pozici

faktor	D.F.	F	p
skupina	3	38,0677	0,0002
měsíc	4	1,4786	0,1351
skupina : měsíc	12	1,3486	0,1377

Sledované kontrasty, hodnoty t a hodnoty p jsou pro jednotlivé zkoumané parametry uvedeny v tabulkách 8 a 9. Kontakt nohy s podložkou, rychlost přešlapu a délka kroku jsou parametry, které u předních i zadních končetin ukázaly po celou dobu experimentu významné rozdíly mezi mutanty a zdravými myšmi (tab. 8; obr. 15). Mezi prvním a pátým měsícem experimentu došlo k signifikantní změně u netrénovaných myší Lurcher ve variačním koeficientu kontaktu předních končetin s podložkou (tab. 8).

Tab 8: Sledované kontrasty, hodnoty t a hodnoty p parametrů chůze pro přední, resp. zadní končetiny hodnocené systémem CatWalk. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

PK - Kontakt nohy s podložkou - CV:

Měsíc	Skupina	Hodnota t	Hodnota p
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,9479	0,8369
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,0167	0,0138
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,5576	0,9355
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,1743	0,9759
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,2573	0,0152
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,1208	0,9759
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,1033	0,9759
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,5360	0,0138
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	1,1100	0,6571
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,6171	0,9355
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,1488	0,0138
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,3101	0,9622
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,0270	1,0000
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,0229	0,0138
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,3713	0,9622
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-2,8713	0,0180
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-0,3932	0,9622
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	1,2311	0,5526
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	1,2997	0,5526

PK - Rychlost přešlapu - CV:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,3479	0,8863
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,6624	0,0103
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,0266	0,9936
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,5682	0,8135
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,3673	0,0103
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,5532	0,8135
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,4556	0,8135
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,9132	0,0103
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,0104	0,9936
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,6444	0,8135
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	8,2249	0,0103
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,2675	0,8863
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,7627	0,8106
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,6123	0,0103
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,7050	0,8135
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-1,2338	0,4530
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-1,2700	0,4530
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	2,1300	0,1555
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	2,1174	0,1555

PK - Délka kroku - CV:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,0626	0,9740
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,2807	0,0099
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,3376	0,9600
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,1583	0,9600
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,3192	0,0099
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,4370	0,9600
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,2174	0,9600
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,2157	0,0099
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,0861	0,9740
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,4936	0,9600
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,1192	0,0099
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,9132	0,7491
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,6108	0,9516
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,2201	0,0099
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,3614	0,5875
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-0,8741	0,7491
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-1,3714	0,5875
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	0,3484	0,9600
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	1,2303	0,5875

ZK - Kontakt nohy s podložkou - CV:

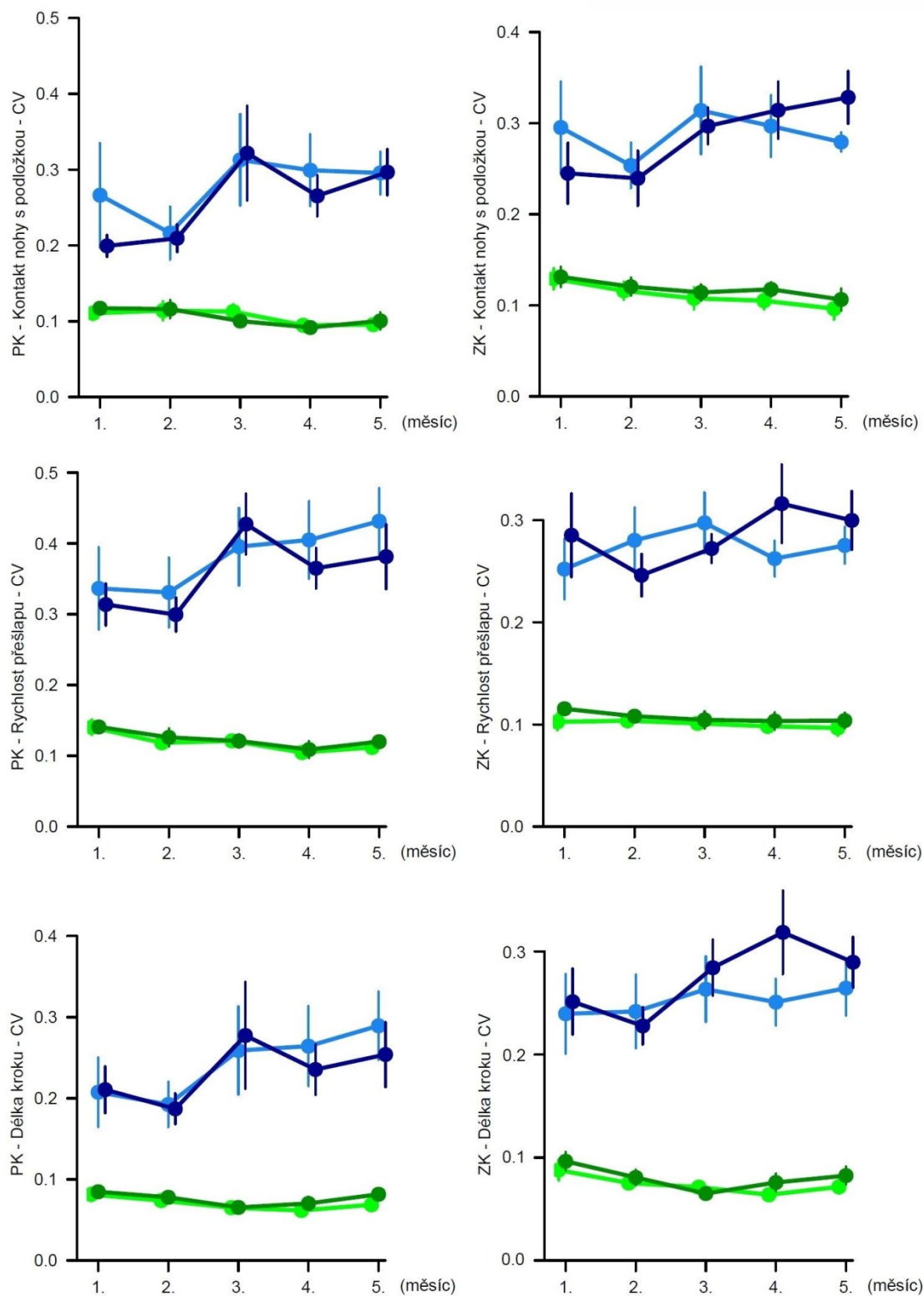
Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,8272	0,7528
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,2056	0,0185
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,1288	0,8941
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,3577	0,8261
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,7168	0,0251
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,3153	0,8261
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,3270	0,8261
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	8,3401	0,0158
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,4286	0,8261
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,3753	0,8261
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,0722	0,0158
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,0117	0,6370
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,5872	0,3028
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	7,0460	0,0158
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,5913	0,8261
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-1,8744	0,2557
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	0,3094	0,8261
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	1,5191	0,3377
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	1,9516	0,2169

ZK - Rychlost přešlapu - CV:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,6553	0,6976
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,1089	0,0142
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,3842	0,5804
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,8962	0,6976
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,4247	0,0142
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,5315	0,7175
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,7619	0,6976
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	10,1013	0,0142
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,3287	0,7818
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,2724	0,5804
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,3947	0,0142
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,4754	0,7284
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,7239	0,6976
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,6080	0,0167
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,6777	0,6976
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-0,2879	0,7818
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-0,6700	0,6976
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	1,3252	0,5804
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	0,5409	0,7175

ZK - Délka kroku - CV:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,2322	0,8144
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,6398	0,0104
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,6257	0,6869
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,3499	0,7605
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	7,4700	0,0104
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,6170	0,6869
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,4970	0,6869
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	7,9338	0,0104
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,9885	0,5641
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,4574	0,5547
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,8580	0,0104
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,2145	0,5547
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,6871	0,6869
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	7,9118	0,0129
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,9954	0,5641
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-0,9434	0,5641
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-0,5269	0,6869
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	1,1219	0,5547
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	1,3279	0,5547



Obr. 15: Časový průběh hodnot parametrů chůze u předních a zadních končetin během ontogeneze. Hodnoceno systémem CatWalk.

● WT_netrénovaní ● WT_trénovaní ● Lc_netrénovaní ● Lc_trénovaní

Rychlost chůze je podle očekávání významně vyšší u zdravých myší než u mutantů. Není zde patrný žádný prokazatelný trend, který by reflektoval zvýšení nebo snížení rychlosti myší během ontogeneze.

Šířka báze předních a zadních končetin a vzdálenost došlapu předních a zadních končetin jsou parametry, v nichž nebyly patrné žádné signifikantní rozdíly, dokonce ani mezi mutanty a zdravými myši.

U parametru relativní doba, kdy jsou v kontaktu s podložkou 2 nohy v laterálním postavení, je ve 4. a 5. měsíci testování pozorovatelné nesignifikantní zlepšení trénovaných myší Lurcher oproti myším netrénovaným. Při porovnání hodnot prvního a pátého měsíce testování zde však není patrný žádný vliv ontogeneze. Relativní doba, kdy jsou v kontaktu s podložkou 2 nohy v laterálním postavení, opět ukazuje jen významné rozdíly mezi mutanty a jejich zdravými kontrolami (tab. 9, obr. 16).

Tab 9: Sledované kontrasty, hodnoty t a hodnoty p pro ostatní parametry chůze zkoumané systémem CatWalk. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Šířka báze PK:

Měsíc	Skupina	Hodnota t	Hodnota p
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,6605	0,7780
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,0423	0,0528
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,4094	0,8328
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,2682	0,8885
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,3400	0,0528
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	2,6365	0,0817
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,1534	0,8885
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,4121	0,0528
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,8890	0,6936
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,1744	0,8885
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,0054	0,0528
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	1,0621	0,6936
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,6702	0,7780
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,5653	0,0528
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	1,6319	0,3648
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-0,8646	0,6936
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-0,4790	0,8328
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	0,8647	0,6936
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	-0,5443	0,8013

Šířka báze ZK:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,4558	0,6022
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	2,8737	0,0969
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,3759	0,9545
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,1497	1,0000
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,1698	0,6022
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,0963	1,0000
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,1480	0,6022
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,0220	0,6022
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,6374	0,7916
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,0361	1,0000
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,6727	0,5148
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,1084	1,0000
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,0226	1,0000
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,6415	0,5148
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,7155	0,7713
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-1,1296	0,6022
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-2,9862	0,1476
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	-0,9732	0,6022
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	-3,0449	0,0969

Rychlost:

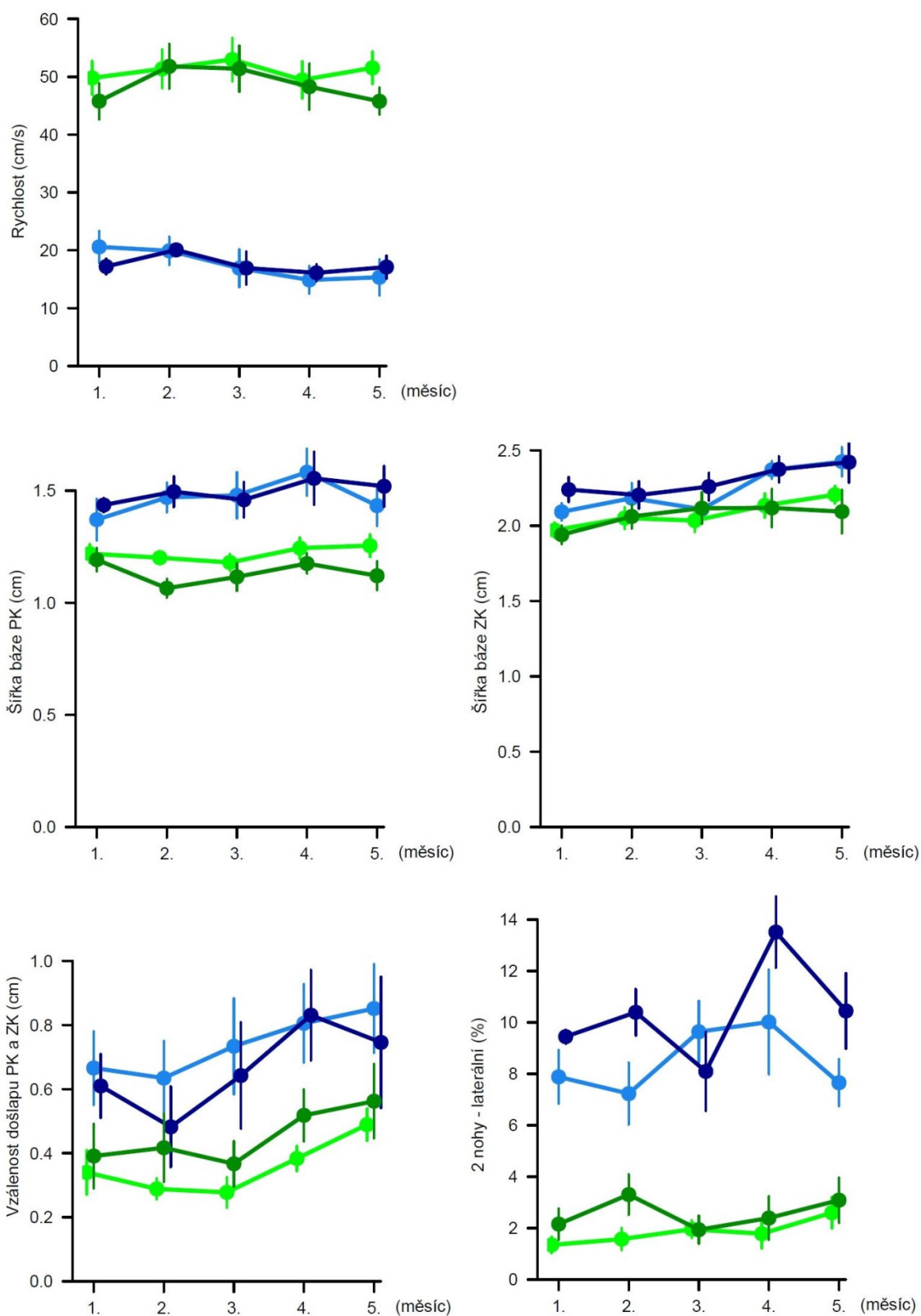
Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-1,0949	0,7184
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-8,3806	0,0133
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,9347	0,7532
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,0620	1,0000
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-8,1041	0,0133
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,0844	1,0000
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,0041	1,0000
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-7,0576	0,0133
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,2918	1,0000
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,4422	1,0000
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-7,5782	0,0141
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,2280	1,0000
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,4808	1,0000
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-9,3407	0,0133
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	1,5798	0,4651
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	0,0380	1,0000
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	1,2619	0,6389
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	0,0054	1,0000
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	-0,4288	1,0000

Vzálenost došlapu PK a ZK:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,3691	0,7922
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,5410	0,6258
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,4169	0,7922
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,8899	0,7565
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,3944	0,7922
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,1527	0,7497
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,4088	0,7922
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,5234	0,6258
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,0443	0,7497
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,1367	0,9153
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,9199	0,6258
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,4931	0,6258
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,4275	0,7922
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,7786	0,7801
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,5779	0,7922
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-0,5966	0,7922
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-1,0323	0,7565
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	-1,1126	0,7497
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	-1,7395	0,6258

Relativní čas, kdy jsou v kontaktu s podložkou 2 nohy v laterální pozici:

Měsíc	Skupina	Hodnota <i>t</i>	Hodnota <i>p</i>
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,4540	0,3900
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	10,9290	0,0146
1	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,1817	0,4320
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	2,0947	0,2228
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	5,8855	0,0146
2	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,9315	0,2228
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,7923	0,5827
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,7700	0,0334
3	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,0291	0,9780
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,4178	0,3936
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	6,8404	0,0146
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,5995	0,7055
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	1,6110	0,3396
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,2915	0,0152
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-0,4578	0,7703
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	-0,6664	0,8409
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	0,1650	0,9093
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	-0,8736	0,5733
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	-1,8214	0,2228



Obr. 16: Časový průběh hodnot ostatních parametrů chůze hodnocených systémem CatWalk během ontogeneze.

● WT_netrenovani ● WT_trénovani ● Lc_netrenovani ● Lc_trénovani

5.1.2. Posouzení motorických schopností na rotarodu

Vyšetření na rotarodu ukázalo významné rozdíly mezi mutanty a jejich zdravými kontrolami, přičemž mutované myši měly podle očekávání výrazně zkrácenou latenci pádu oproti zdravým myším (obr. 17).

Během ontogeneze nedošlo k výraznému zhoršení ani zlepšení výkonu na rotarodu u žádné ze skupin myší kmene B6CBA. Vliv ontogeneze byl patrný pouze u myší typu pcd, u kterých došlo k významnému zhoršení v pátém měsíci oproti měsíci prvnímu.

Signifikantní rozdíl vlivem motorického učení byl zaznamenán v prvním měsíci u trénovaných i netrénovaných myší typu wild kmene B6CBA. U mutantních myší je schopnost motorického učení zanedbatelná.

Skupiny trénovaných a netrénovaných myší se svými výkony od sebe nijak významně nelišily. Nucená fyzická aktivita nepřinesla během celého testovaného období žádné průkazné zlepšení u žádné skupiny myší.

Výsledky GLS modelu jsou uvedeny v tabulce 10. Sledované kontrasty spolu s hodnotami t a hodnotami p jsou uvedeny v tabulce 11.

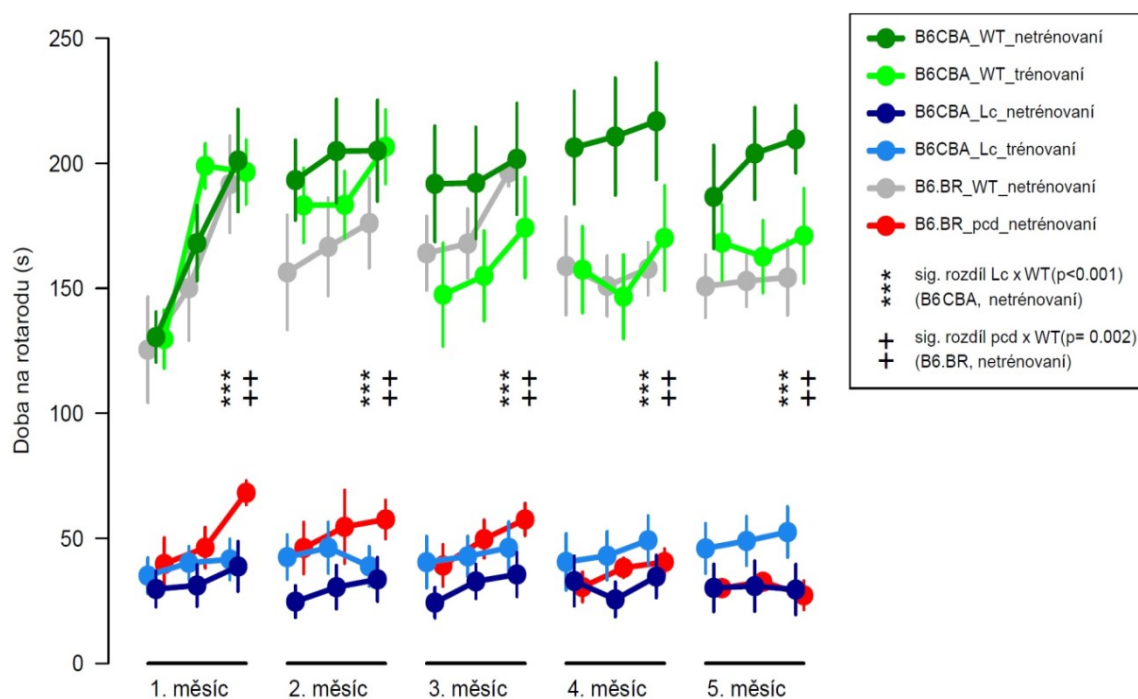
Tab 10: Výsledky GLS modelu popisujícího vliv jednotlivých faktorů a jejich interakcí na latenci pádu v testu na rotarodu. Statistická signifikance (p) je založena na permutačním testu původního modelu. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

faktor	D.F.	F	p
skupina	5	19,0779	<0,001
měsíc	4	0,4462	0,4942
den	2	8,8764	<0,001
skupina : měsíc	20	3,0452	<0,001
skupina : den	10	1,6784	0,004
měsíc : den	8	1,9286	0,003
skupina : měsíc : den	40	0,996	0,189
reziduály	795		

Tab 11: Sledované kontrasty, hodnoty t a hodnoty p u vyšetření na rotarodu. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Měsíc	Den	Skupina	Hodnota t	Hodnota p
1	3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrenování	0,2218	0,9393
2	3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrenování	0,4448	0,8695
3	3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrenování	0,7868	0,7711
4	3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrenování	1,1211	0,6127
5	3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrenování	1,6117	0,3333
1	3	B6.BR_pcd_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	2,6782	0,1185
2	3	B6.BR_pcd_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	2,0586	0,2384
3	3	B6.BR_pcd_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	2,0184	0,2386
4	3	B6.BR_pcd_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	0,5806	0,8695
5	3	B6.BR_pcd_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	-0,1987	0,9470
1	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	7,1357	0,0003
2	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	7,7630	0,0003
3	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	6,9545	0,0003
4	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	7,3393	0,0003
5	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_Lc_netrenování	10,707	0,0003
1	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_WT_trénování	0,1905	0,9470
2	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_WT_trénování	-0,0633	0,9546
3	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_WT_trénování	0,9222	0,7028
4	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_WT_trénování	1,4915	0,3923
5	3	B6CBA_WT_netrenování x B6CBA_WT_trénování	1,6598	0,3305
1	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6CBA_WT_netrenování	-0,3357	0,8974
2	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6CBA_WT_netrenování	-1,0697	0,6250
3	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6CBA_WT_netrenování	-0,2385	0,9393
4	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6CBA_WT_netrenování	-2,3051	0,1321
5	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6CBA_WT_netrenování	-2,7402	0,0923
1	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6.BR_pcd_netrenování	6,2057	0,0040
2	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6.BR_pcd_netrenování	6,0828	0,0040
3	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6.BR_pcd_netrenování	16,4710	0,0040
4	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6.BR_pcd_netrenování	9,9928	0,0040
5	3	B6.BR_Wt_netrenování x B6.BR_pcd_netrenování	7,9037	0,0040
1. x 5.	3	B6.BR_Wt_netrenování	1,5283	0,3923
1. x 5.	3	B6CBA_WT_netrenování	-0,3457	0,8974
1. x 5.	3	B6CBA_WT_trénování	1,1147	0,6127
1. x 5.	3	B6CBA_Lc_trénování	-0,8409	0,7183
1. x 5.	3	B6CBA_Lc_netrenování	0,6532	0,8205
1. x 5.	3	B6.BR_pcd_netrenování	5,5148	0,0112
1	1. x 3.	B6.BR_Wt_netrenování	-2,3157	0,1331
2	1. x 3.	B6.BR_Wt_netrenování	-0,6787	0,8118
3	1. x 3.	B6.BR_Wt_netrenování	-2,0483	0,2154
4	1. x 3.	B6.BR_Wt_netrenování	0,0470	0,9546
5	1. x 3.	B6.BR_Wt_netrenování	-0,1752	0,9470
1	1. x 3.	B6CBA_WT_trénování	-3,8565	0,0080
2	1. x 3.	B6CBA_WT_trénování	-1,1187	0,6127
3	1. x 3.	B6CBA_WT_trénování	-0,9320	0,7028

4	1. x 3.	B6CBA_WT_trénování	-0,4692	0,8695
5	1. x 3.	B6CBA_WT_trénování	-0,1157	0,9494
1	1. x 3.	B6CBA_WT_netrenování	-3,0977	0,0337
2	1. x 3.	B6CBA_WT_netrenování	-0,4542	0,8695
3	1. x 3.	B6CBA_WT_netrenování	-0,3115	0,8974
4	1. x 3.	B6CBA_WT_netrenování	-0,3231	0,8974
5	1. x 3.	B6CBA_WT_netrenování	-0,9341	0,7028
1	1. x 3.	B6CBA_Lc_trénování	-0,6014	0,8501
2	1. x 3.	B6CBA_Lc_trénování	0,3090	0,8974
3	1. x 3.	B6CBA_Lc_trénování	-0,3950	0,8974
4	1. x 3.	B6CBA_Lc_trénování	-0,5803	0,8623
5	1. x 3.	B6CBA_Lc_trénování	-0,4602	0,8695
1	1. x 3.	B6CBA_Lc_netrenování	-0,7379	0,7767
2	1. x 3.	B6CBA_Lc_netrenování	-0,8193	0,7183
3	1. x 3.	B6CBA_Lc_netrenování	-1,0496	0,6250
4	1. x 3.	B6CBA_Lc_netrenování	-0,1366	0,9493
5	1. x 3.	B6CBA_Lc_netrenování	0,0492	0,9494
1	1. x 3.	B6.BR_pcd_netrenování	-2,4956	0,1349
2	1. x 3.	B6.BR_pcd_netrenování	-0,8924	0,7077
3	1. x 3.	B6.BR_pcd_netrenování	-1,7552	0,3333
4	1. x 3.	B6.BR_pcd_netrenování	-1,2598	0,5672
5	1. x 3.	B6.BR_pcd_netrenování	0,4712	0,8695



Obr. 17: Průměrné latence pádu jednotlivých skupin myší na rotarodu v průběhu celého experimentu.

5.1.3. Měření svalové síly

V testu měření svalové síly se skupina myši pcd jednoznačně jeví jako nejslabší. Signifikantně se liší od ostatních skupin v 1., 3., 4. a 5. měsíci testování. Významné rozdíly byly zjištěny i mezi skupinami myši Lurcher netréňovanými a jejich zdravými kontrolami - netréňovanými myši typu wild, a to v 1. a 2. měsíci testování. Vliv ontogeneze ani vliv tréninku není patrný (tab. 13; obr. 18). Výsledky GLS modelu pro měření svalové síly jsou uvedeny v tabulce 12. Sledované kontrasty, hodnoty t a hodnoty p jsou uvedeny v tabulce 13.

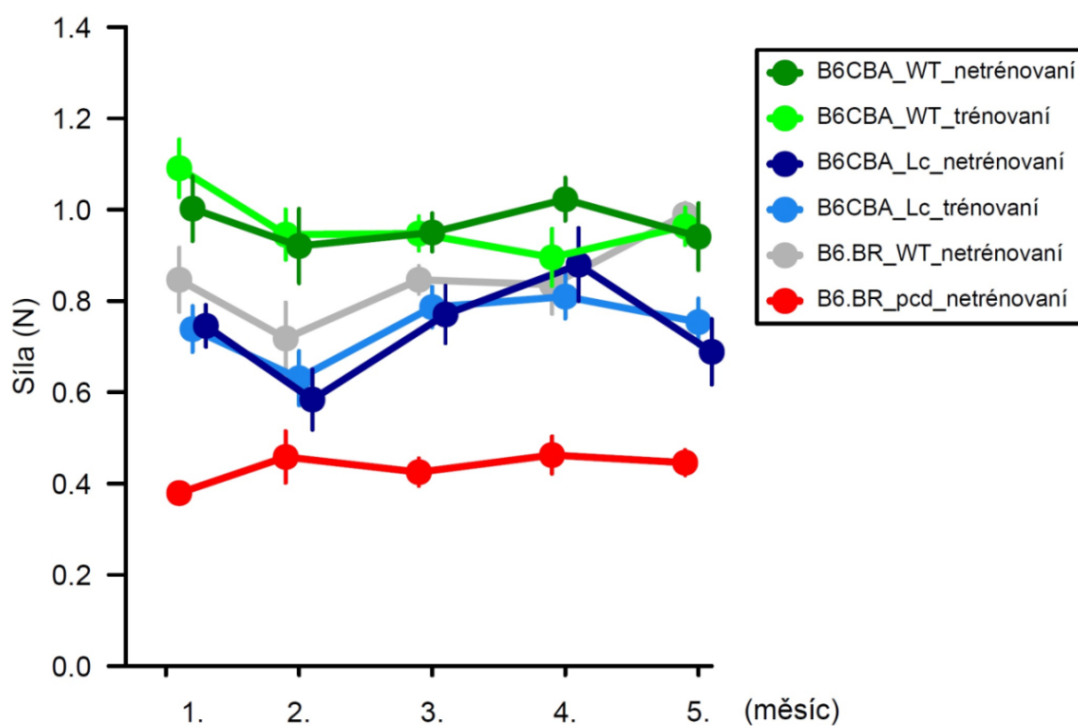
Tab 12: Výsledky GLS modelu popisujícího vliv jednotlivých faktorů a jejich interakcí na svalovou sílu. Statistická signifikance (p) je založena na permutačním testu původního modelu. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

faktor	D.F.	F	p
skupina	5	23,6377	<0,001
měsíc	4	6,246	<0,001
skupina : měsíc	20	2,105	0,005
reziduály	265		

Tab 13: Sledované kontrasty, hodnoty t a hodnoty p u vyšetření svalové síly. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Měsíc	Skupina	Hodnota t	Hodnota p
1	B6.BR_WT_netrénování x B6.BR_pcd_netrénování	6,3175	0,0073
1	B6.BR_pcd_netrénování x B6CBA_Lc_netrénování	7,1594	0,0050
1	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrénování	0,1026	0,9412
1	B6CBA_WT_netrénování x B6CBA_Lc_netrénování	-3,0419	0,0303
1	B6.BR_WT_netrénování x B6CBA_WT_netrénování	-1,5599	0,2336
1	B6CBA_WT_netrénování x B6CBA_WT_trénování	0,9327	0,5504
2	B6.BR_WT_netrénování x B6.BR_pcd_netrénování	2,6717	0,0747
2	B6.BR_pcd_netrénování x B6CBA_Lc_netrénování	1,4452	0,2833
2	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrénování	-0,5239	0,7223
2	B6CBA_WT_netrénování x B6CBA_Lc_netrénování	-3,2036	0,0258
2	B6.BR_Wt_netrénování x B6CBA_WT_netrénování	-1,7847	0,2108
2	B6CBA_WT_netrénování x B6CBA_WT_trénování	0,2543	0,8958
3	B6.BR_WT_netrénování x B6.BR_pcd_netrénování	9,7926	0,0066
3	B6.BR_pcd_netrénování x B6CBA_Lc_netrénování	4,9798	0,0073
3	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netrénování	-0,2099	0,8958
3	B6CBA_WT_netrénování x B6CBA_Lc_netrénování	-2,3896	0,0747
3	B6.BR_WT_netrénování x B6CBA_WT_netrénování	-1,9987	0,1606
3	B6CBA_WT_netrénování x B6CBA_WT_trénování	-0,0404	1,0000
4	B6.BR_WT_netrénování x B6.BR_pcd_netrénování	4,9179	0,0073

4	B6.BR_pcd_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	4,6411	0,0066
4	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	0,7484	0,6461
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-1,5394	0,2336
4	B6.BR_Wt_netřénování x B6CBA_WT_netřénování	-2,3496	0,0874
4	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	-1,6243	0,2227
5	B6.BR_WT_netřénování x B6.BR_pcd_netřénování	14,4326	0,0066
5	B6.BR_pcd_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	3,1559	0,0425
5	B6CBA_Lc_trénování x B6CBA_Lc_netřénování	-0,7386	0,6461
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_Lc_netřénování	-2,4611	0,0747
5	B6.BR_WT_netřénování x B6CBA_WT_netřénování	0,6242	0,6882
5	B6CBA_WT_netřénování x B6CBA_WT_trénování	0,2711	0,8958
1 x 5	B6.BR_pcd_netřénování	-1,8600	0,2227
1 x 5	B6CBA_Lc_netřénování	0,6672	0,6726
1 x 5	B6CBA_Lc_trénování	-0,2136	0,8958
1 x 5	B6CBA_WT_netřénování	0,6022	0,6882
1 x 5	B6.BR_WT_netřénování	-1,9084	0,1991
1 x 5	B6CBA_WT_trénování	1,6891	0,2190



Obr. 18: Svalová síla jednotlivých skupin myší v průběhu pěti měsíců.

5.2. Motorické funkce u šestiměsíčních myší a zhodnocení vlivu nucené fyzické aktivity

5.2.1. Kvantitativní analýza chůze pomocí systému CatWalk

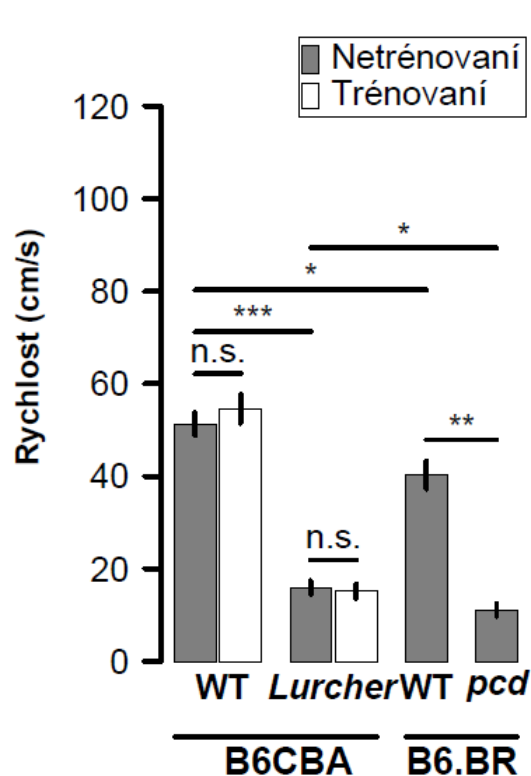
Pro zhodnocení vlivu tréninku byla použita data od všech testovaných myší, vždy z pátého měsíce experimentu (tzn. myši ve věku 6 měsíců). Vliv nucené fyzické aktivity však nebyl patrný u žádného z hodnocených parametrů. Výsledky testu ANOVA pro zvolené parametry chůze jsou uvedeny v tabulce 14.

Tab. 14: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na jednotlivé parametry chůze hodnocené systémem CatWalk u myší ve věku 6 měsíců. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

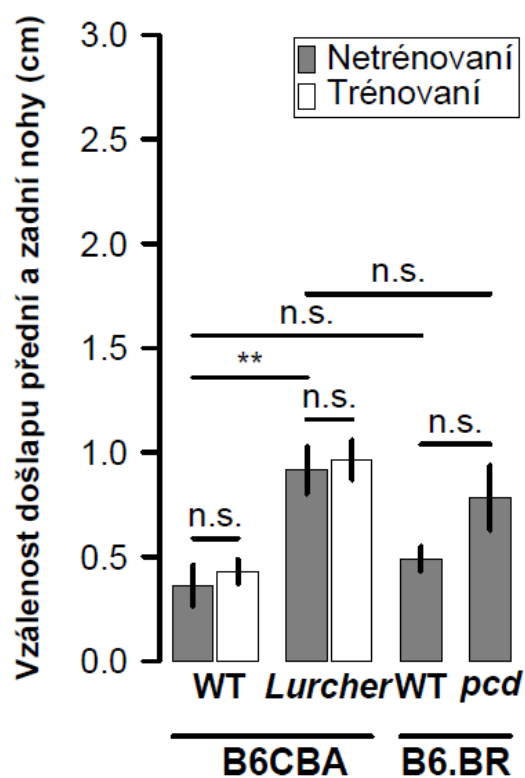
Parametr	<i>F</i> (5,53)	<i>p</i>
Rychlost	74,0461	<0,001
Šířka báze PK	9,0416	<0,001
Šířka báze ZK	4,1664	0,0040
Vzdálenost došlapu přední a zadní nohy	7,7767	<0,001
PK - Kontakt nohy s podložkou	45,8885	<0,001
PK - Kontakt nohy s podložkou - CV	47,4966	<0,001
PK - Rychlost přešlapu	61,0622	<0,001
PK - Rychlost přešlapu - CV	57,3383	<0,001
PK - Délka kroku	73,5550	<0,001
PK - Délka kroku - CV	29,9644	<0,001
ZK - Kontakt nohy s podložkou	33,6787	<0,001
ZK - Kontakt nohy s podložkou - CV	72,3390	<0,001
ZK - Rychlost přešlapu	61,8773	<0,001
ZK - Rychlost přešlapu - CV	54,2555	<0,001
ZK - Délka kroku	88,3717	<0,001
ZK - Délka kroku - CV	54,8877	<0,001
Bez kontaktu s podložkou	0,5026	0,8480
Kontakt s podložkou - 1 noha	3,7362	0,0070
Kontakt s podložkou - 2 nohy - diagonální	69,7050	<0,001
Kontakt s podložkou - 2 nohy - laterální	12,0995	<0,001
Kontakt s podložkou - 2 nohy - pletenec	2,0673	0,0770
Kontakt s podložkou - 3 nohy	61,0072	<0,001
Kontakt s podložkou - 4 nohy	9,6166	<0,001
Nepravidelná chůze	6,1220	<0,001
Křížový vzorec chůze	4,2167	0,0030
Střídavý vzorec chůze	1,1800	0,3210
Rotační vzorec chůze	6,0385	<0,001

Jedním z nejdůležitějších parametrů pro zhodnocení rozdílů v chůzi u mutantních myší a jejich kontrol je rychlost chůze (obr. 19). Byly zde shledány velmi významné genotypové rozdíly mezi myši typu Lurcher a wild u kmene B6CBA a mezi myši typu pcd a wild u kmene B6.BR. Vliv genetického pozadí byl patrný při srovnání zdravých myší kmene B6CBA a kmene B6.BR i při srovnání mutantních myší Lurcher s mutanty pcd.

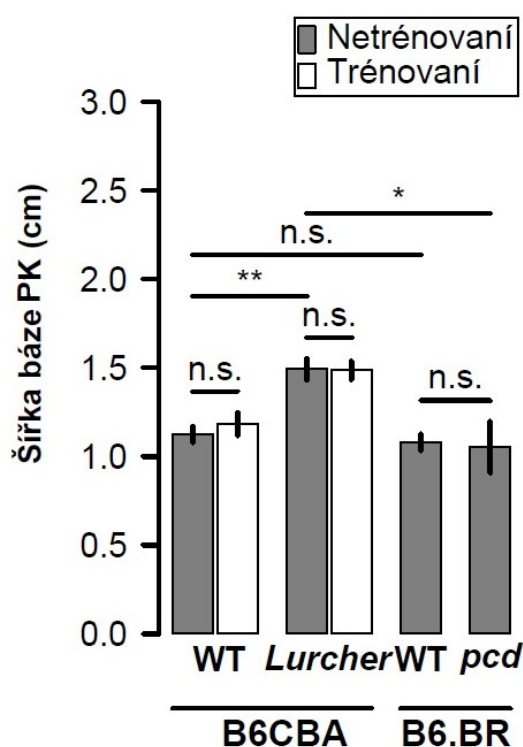
Myši typu Lurcher se dále od svých zdravých kontrol významně lišily ve vzdálenosti došlapu přední a zadní nohy (obr. 20). Šířka báze předních končetin u myší Lurcher se signifikantně lišila od ostatních skupin (obr. 21), v šířce báze zadních končetin nebyly shledány žádné rozdíly mezi jednotlivými skupinami (obr. 22).



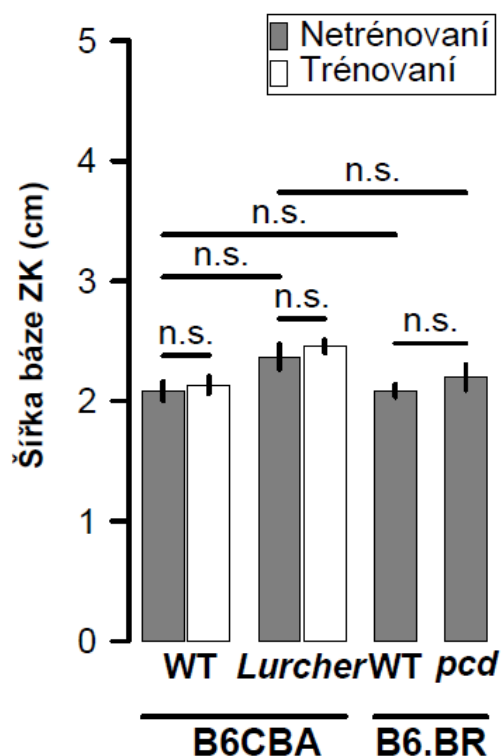
Obr. 19: Rychlost chůze u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců.



Obr. 20: Vzdálenost došlapu předních a zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců.



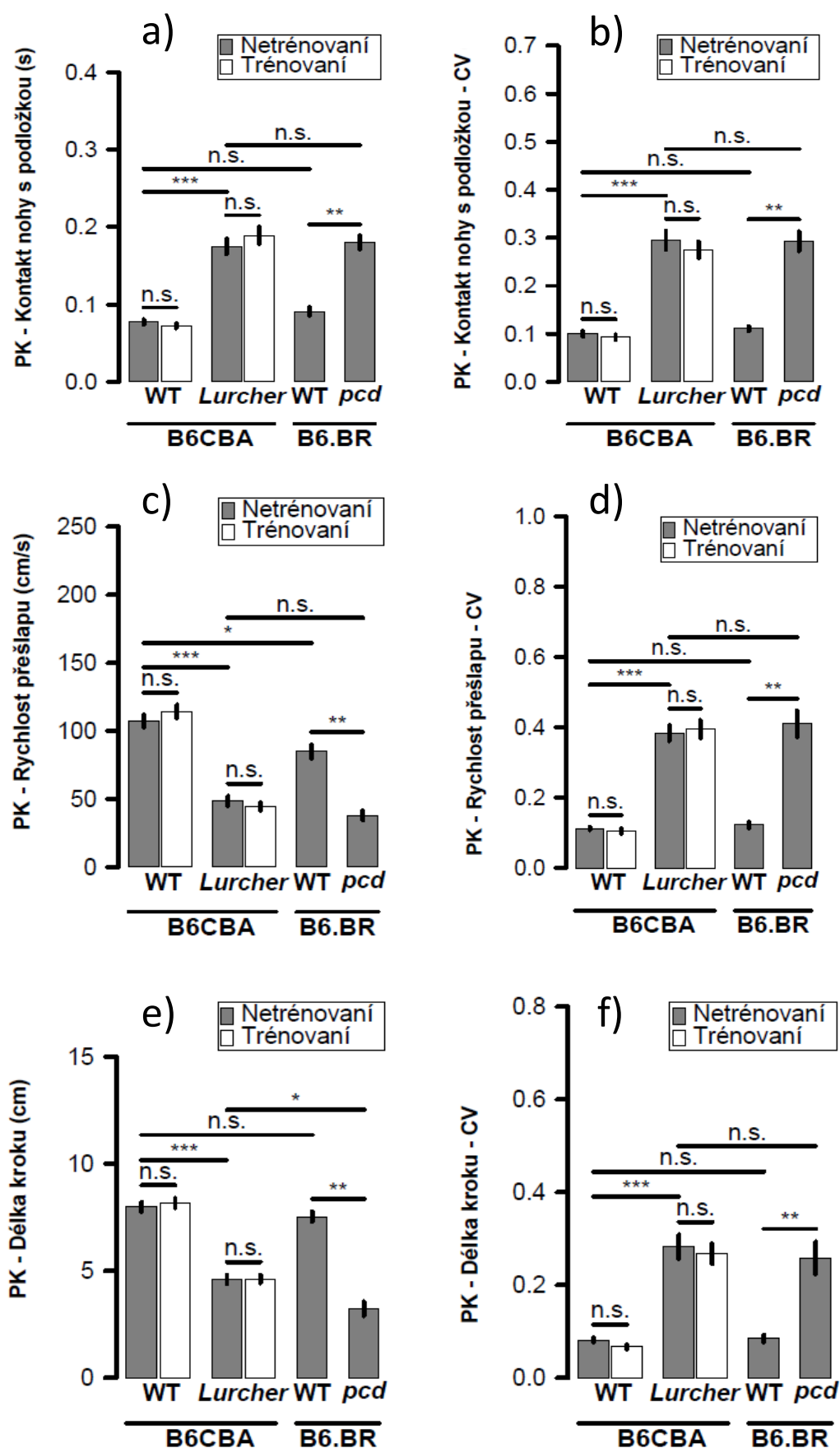
Obr. 21: Šířka báze předních končetin (PK) u jednotlivých skupin myši ve věku 6 měsíců.



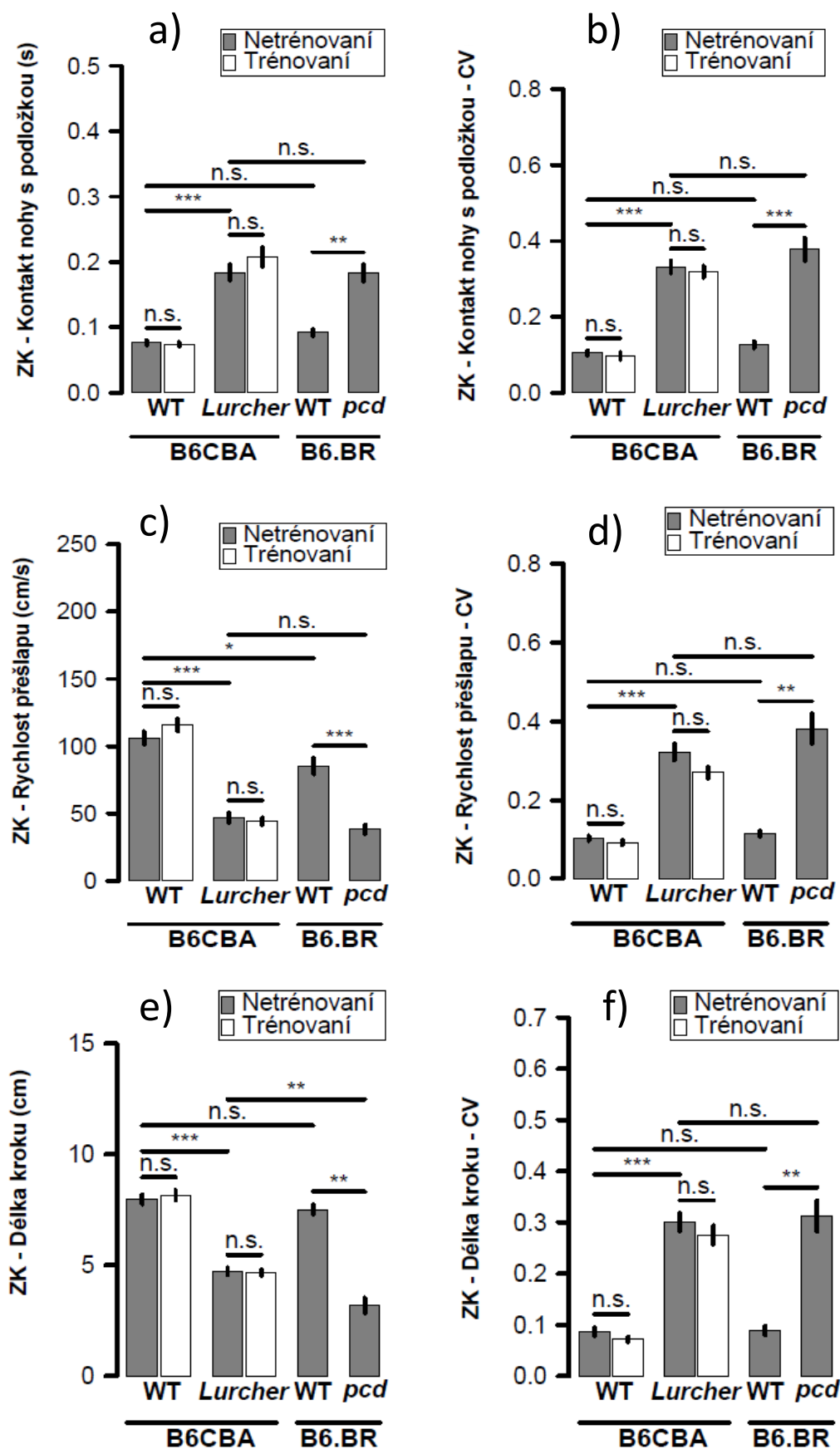
Obr. 22: Šířka báze zadních končetin (ZK) u jednotlivých skupin myši ve věku 6 měsíců.

Pro kvantifikaci chůze předních, resp. zadních končetin, byly zvoleny parametry: kontakt nohy s podložkou, rychlost přešlapu, délka kroku a jejich variační koeficienty. U všech parametrů byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi mutanty a jejich zdravými kontrolami (obr. 23, 24).

Rychlost přešlapu se však významně lišila i mezi zdravými myši kmenů B6CBA a B6.BR a to jak u předních (obr. 23 c), tak i u zadních končetin (obr. 24 c). Délka kroku předních i zadních končetin byla prokazatelně nejkratší u myši typu pcd, významně se lišila i od myši typu Lurcher (obr. 23 e, 24 e).

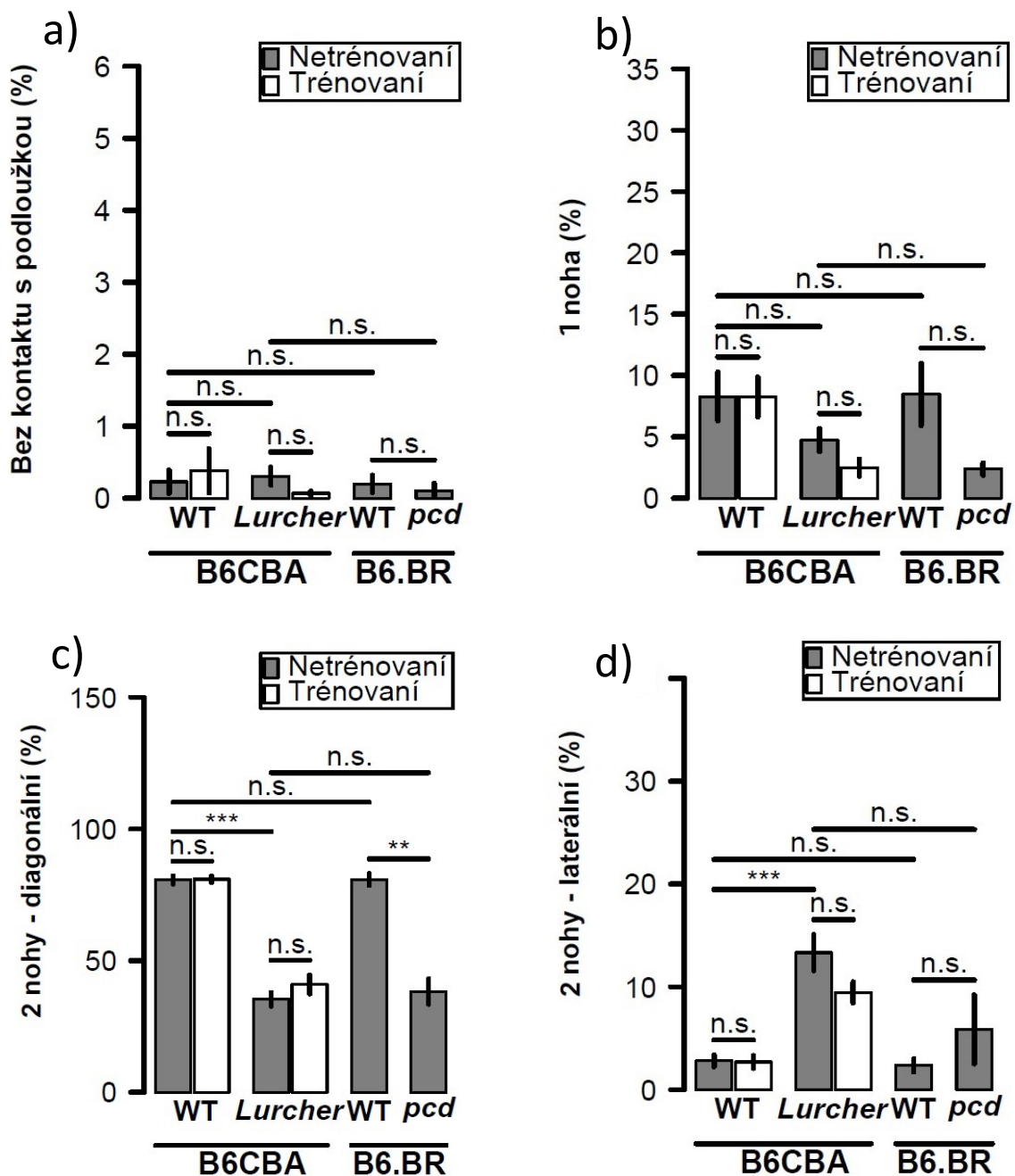


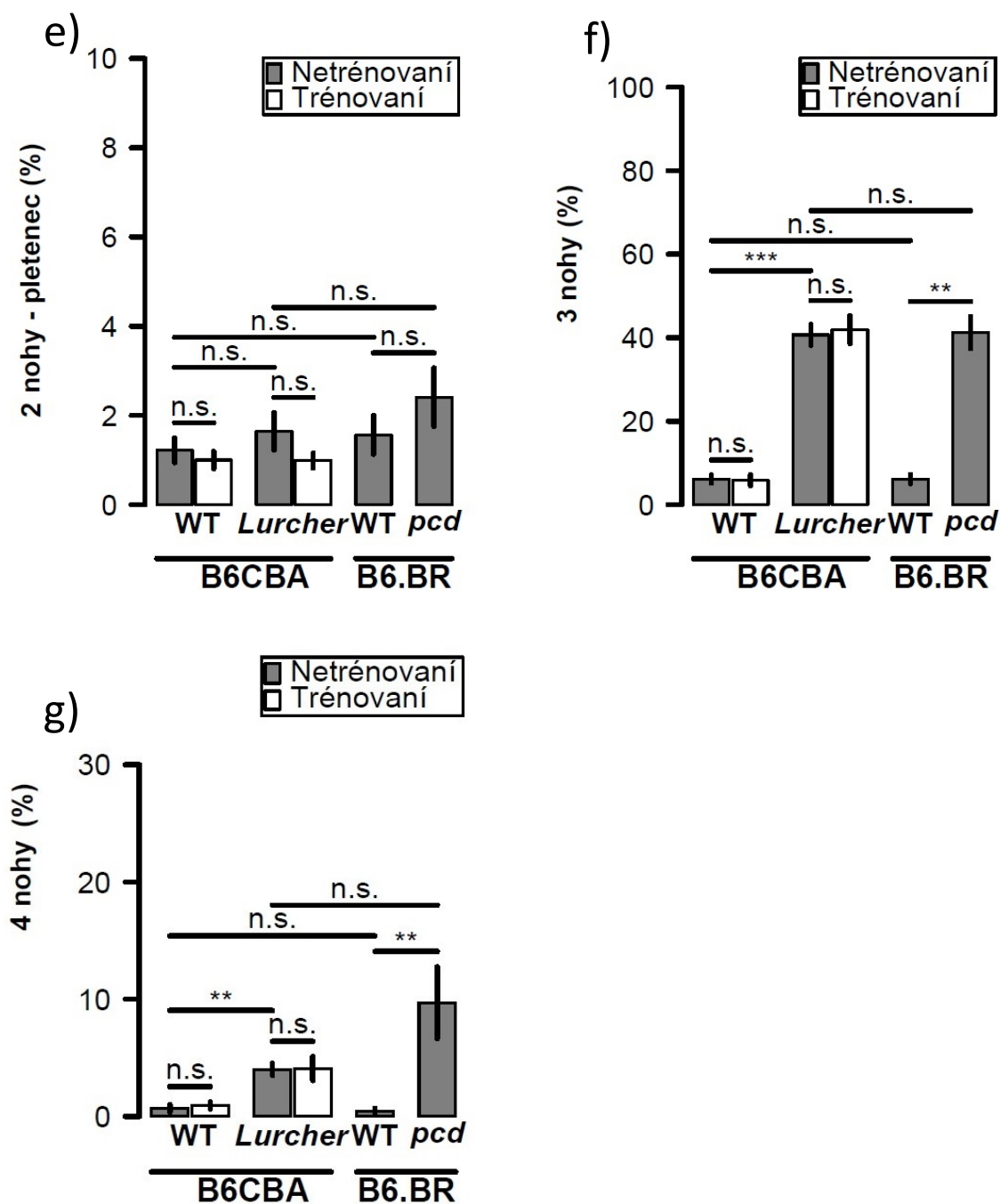
Obr. 23 a, b, c, d, e, f: Parametry chůze pro přední končetiny (PK) - kontakt nohy s podložkou (a), rychlost přešlapu (c), délka kroku (e) a příslušné variační koeficienty (b, d, f) u jednotlivých skupin myši ve věku 6 měsíců. Hodnoceno systémem CatWalk.



Obr. 24 a, b, c, d, e, f: Parametry chůze pro zadní končetiny (ZK) - kontakt nohy s podložkou (a), rychlost přešlapu (c), délka kroku (e) a příslušné variační koeficienty (b, d, f) u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Hodnoceno systémem CatWalk.

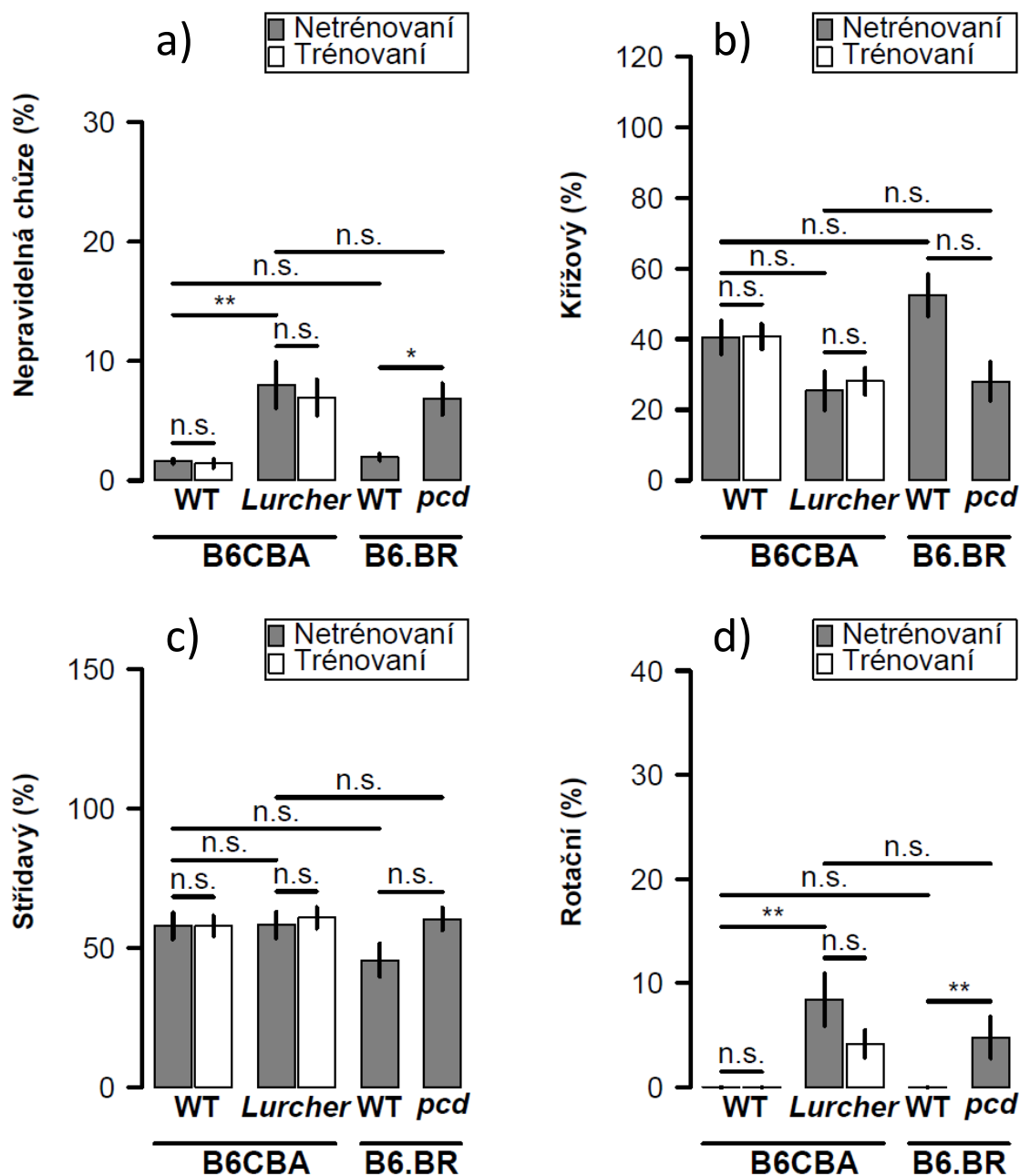
Relativní čas, kdy je v kontaktu s podložkou daná kombinace nohou je faktor, který ukazuje schopnost myši udržovat rovnováhu (obr. 25). Pro zdravé myši je typické, že se při chůzi opírají o dvě nohy, nejčastěji v diagonálním postavení. Tímto se významně liší od myši Lurcher, které toto diagonální postavení preferují výrazně méně (obr. 25 c). Laterální postavení dvou nohou se naopak častěji vyskytuje u myši typu Lurcher (obr. 25 d). Oba typy mutantů, Lurcher i pcd, se pak na rozdíl od zdravých myši výrazně častěji opírají o tři nebo čtyři nohy najednou (obr. 25 f, g).





Obr. 25 a, b, c, d, e, f, g: Relativní čas, kdy mají jednotlivé skupiny myši ve věku 6 měsíců v kontaktu s podložkou určitou kombinací nohou – bez kontaktu s podložkou (a), 1 noha (b), 2 nohy v diagonálním postavení (c), 2 nohy v laterálním postavení (d), 2 nohy jednoho pletence (e), 3 nohy (f), 4 nohy (g).

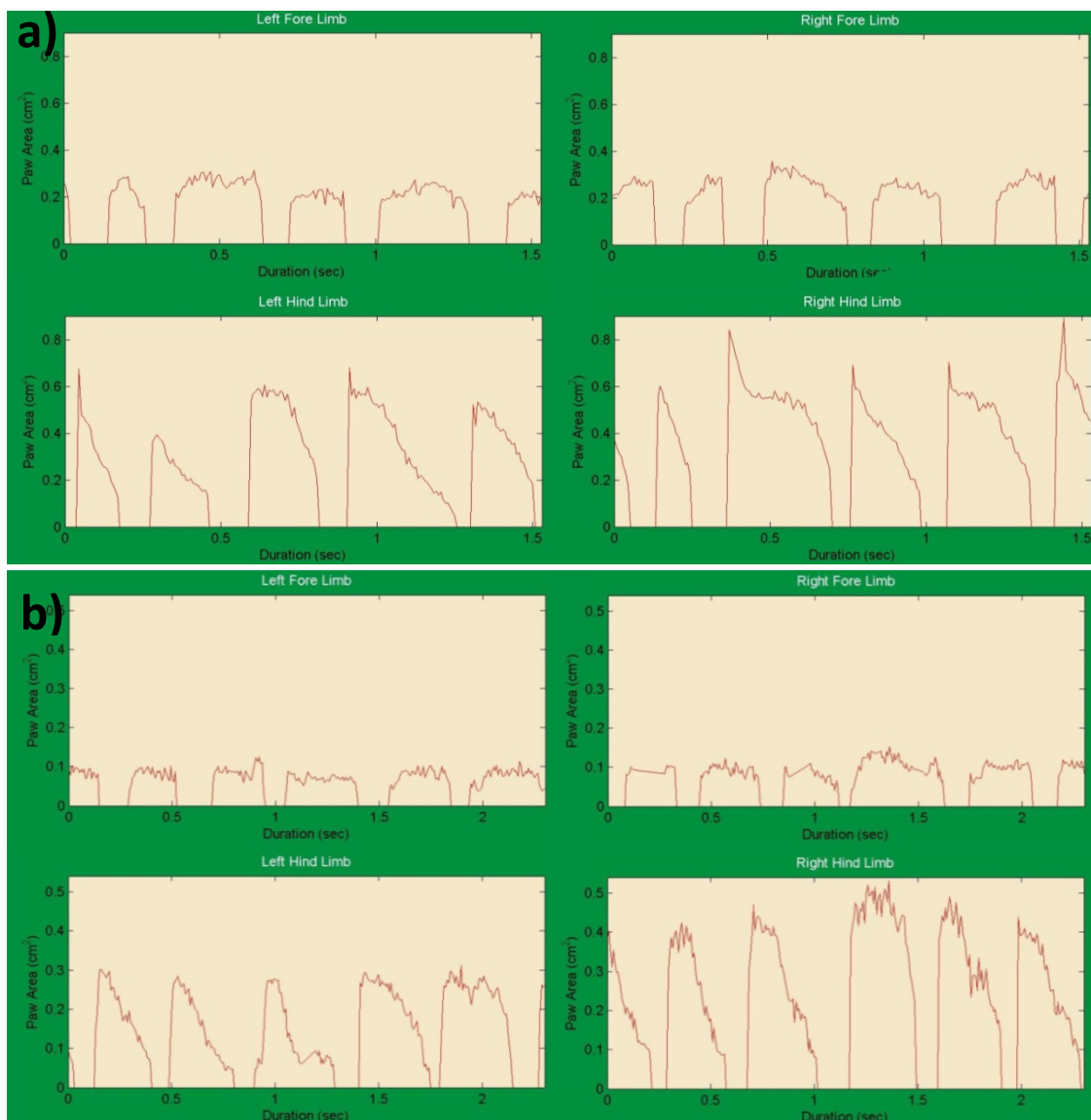
Mutanti se dále od svých zdravých kontrol liší ve vzorcích chůze (obr. 26). U všech myší se nejčastěji vyskytují křížové a střídavé vzorce chůze. U obou typů mutantů se však navíc objevují i vzorec rotační a nepravidelná chůze.



Obr. 26 a, b, c, d: Relativní čas, kdy šly jednotlivé skupiny myší ve věku 6 měsíců podle daného vzorce chůze – nepravidelná chůze (a), křížový vzorec (b), střídavý vzorec (c), rotační vzorec (d).

5.2.2. Kvantitativní analýza chůze pomocí systému DigiGait

Ilustrativní záznamy chůze z přístroje DigiGait typické pro mutantní myši Lurcher a jejich kontroly jsou uvedeny na obrázku 27.



Obr. 27: Záznamy chůze z přístroje DigiGait typické pro myši typu wild (a) a Lurcher (b). Rychlost chůze 10 cm/s.

Výsledky z testu DigiGait nezahrnují data sbíraná pro kvantifikaci chůze během ontogeneze, data z prvního až čtvrtého měsíce neobsahovala dostatečný počet myší v jednotlivých skupinách, aby mohlo dojít k řádnému statistickému zpracování. Byla použita pouze data z pátého měsíce experimentu ke zhodnocení motorických funkcí u myší ve věku 6 měsíců, ke zhodnocení vlivu tréninku a pro srovnání dvou přístrojů kvantifikujících ataktickou chůzi – CatWalk a DigiGait. Výsledky z testu ANOVA pro parametry chůze měřené přístrojem DigiGait jsou uvedeny v tabulce 15.

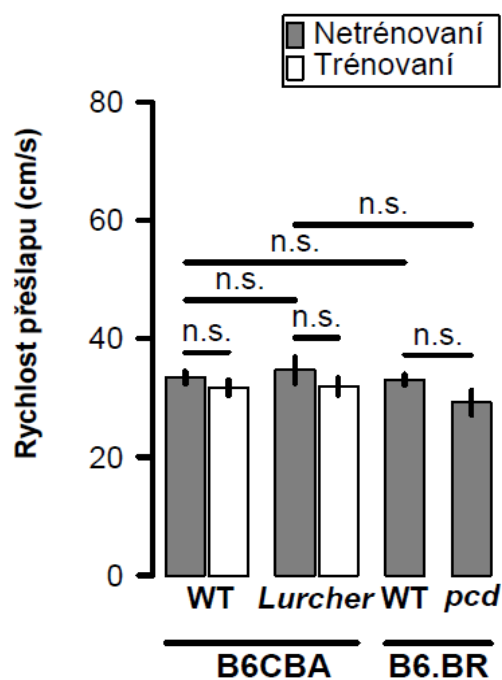
Tab. 15: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na jednotlivé parametry chůze hodnocené systémem DigiGait u myši ve věku 6 měsíců. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

	Parametr	F	p
Přední končetiny	Rychlost přešlapu	1,1227	0,3669
	Kontakt nohy s podložkou	3,3760	0,0082
	Délka kroku	3,2935	0,0098
	Úhel nohy	1,7007	0,1498
	Variabilita úhlu nohy	1,6633	0,1586
	Šířka báze	3,9800	0,0054
	Délka kroku - CV	1,4624	0,2266
	Šířka báze - CV	5,5324	0,0008
Zadní končetiny	Rychlost přešlapu	2,1605	0,0698
	Kontakt nohy s podložkou	2,7261	0,0304
	Délka kroku	4,6434	0,0010
	Úhel nohy	1,3160	0,2737
	Variabilita úhlu nohy	0,7560	0,6009
	Šířka báze	0,3074	0,9030
	Délka kroku - CV	0,8007	0,5633
	Šířka báze - CV	2,1629	0,0650

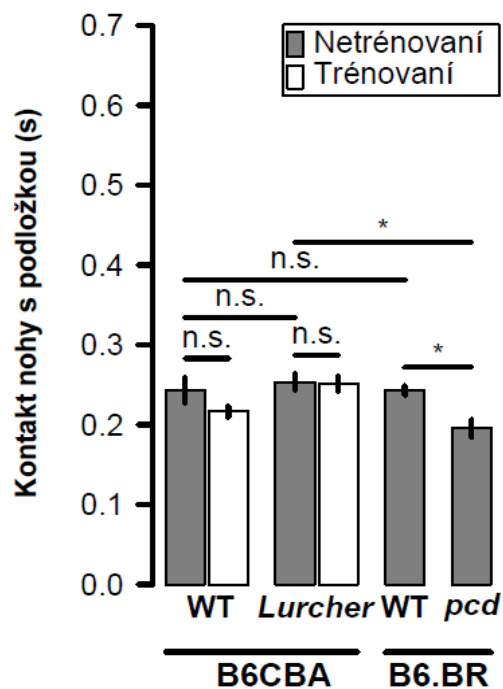
Systém DigiGait neodhalil žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami u parametru rychlost přešlapu, a to ani u předních (obr. 28), ani u zadních končetin (obr. 36). Myši pcd byly vyhodnoceny jako významně odlišné od ostatních skupin v parametrech kontakt nohy s podložkou (obr. 29, 37) a délka kroku (obr. 30, 38) u předních i zadních končetin. Variační koeficient délky kroku předních ani zadních končetin se u jednotlivých skupin myši významně nelišil (obr. 31, 39).

Šířka báze u předních končetin se lišila mezi myšmi pcd a jejich zdravými kontrolami (obr. 34). Šířka báze u zadních končetin se pak mezi jednotlivými porovnávanými skupinami nelišila (obr. 42). Variační koeficient šířky báze u předních končetin přinesl nejen významné rozdíly mezi mutanty a jejich zdravými kontrolami, ale ukázal také signifikantní rozdíl mezi trénovanými a netrénovanými myšmi typu Lurcher (obr. 35). Variační koeficient šířky báze u zadních končetin se pak významně lišil pouze u myši typu Lurcher a wild kmene B6CBA (obr. 43).

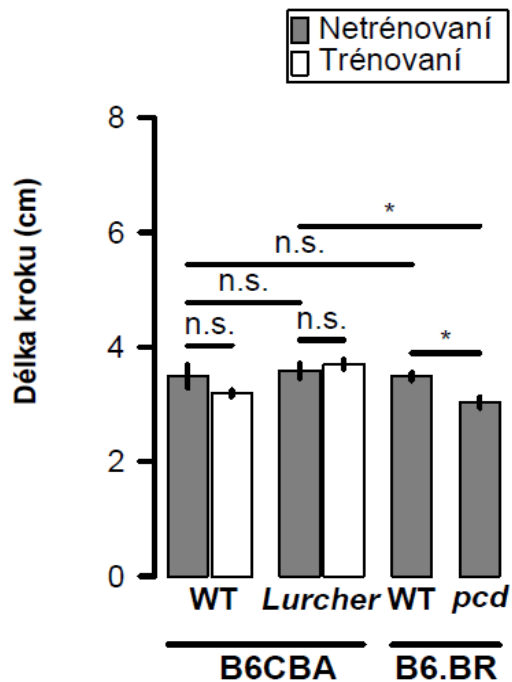
V parametrech úhel nohy a variabilita úhlu nohy nebyly shledány žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami u předních (obr. 32, 33) ani zadních končetin (obr. 40, 41).



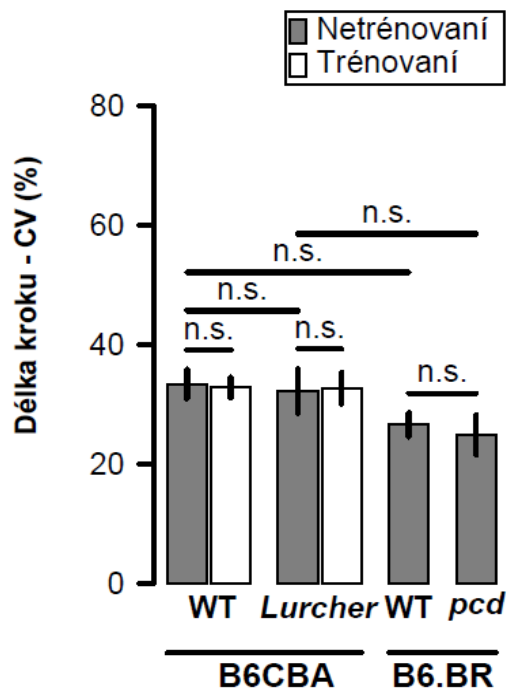
Obr. 28: Rychlost přešlapu předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



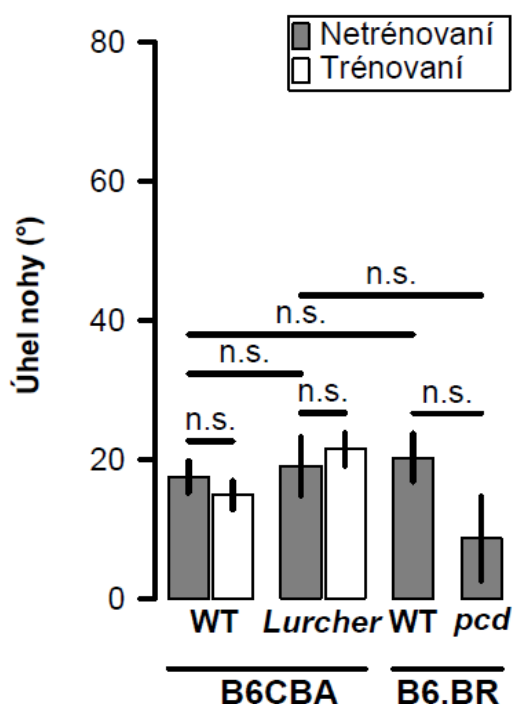
Obr. 29: Doba kontaktu předních končetin s podložkou u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



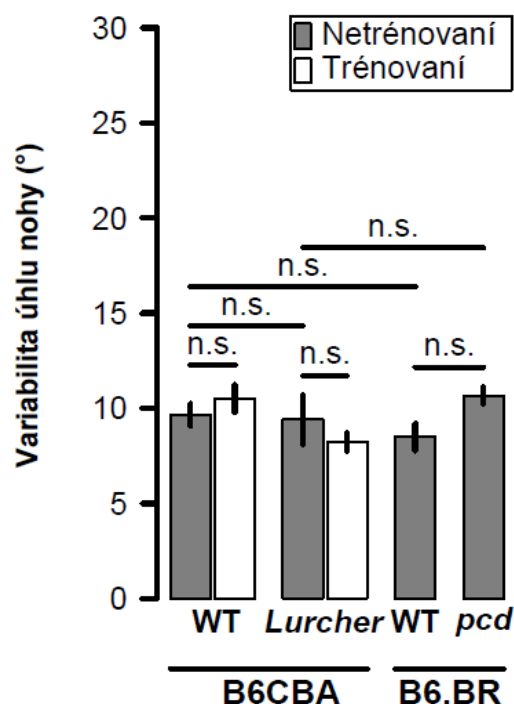
Obr. 30: Délka kroku předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



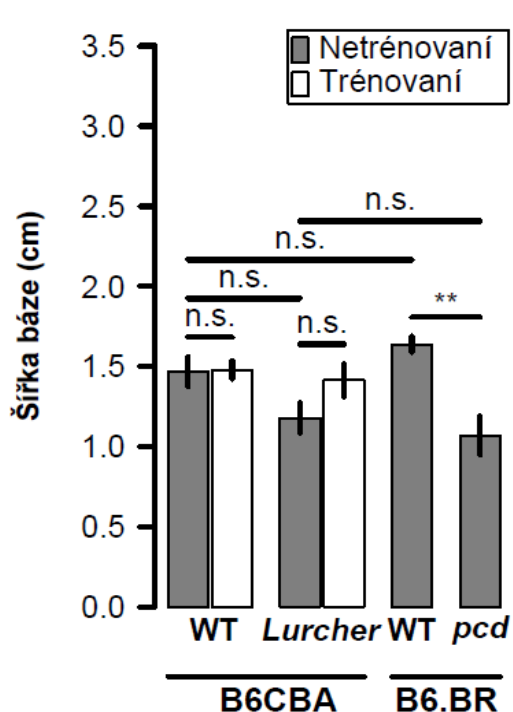
Obr. 31: Variační koeficient délky kroku předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



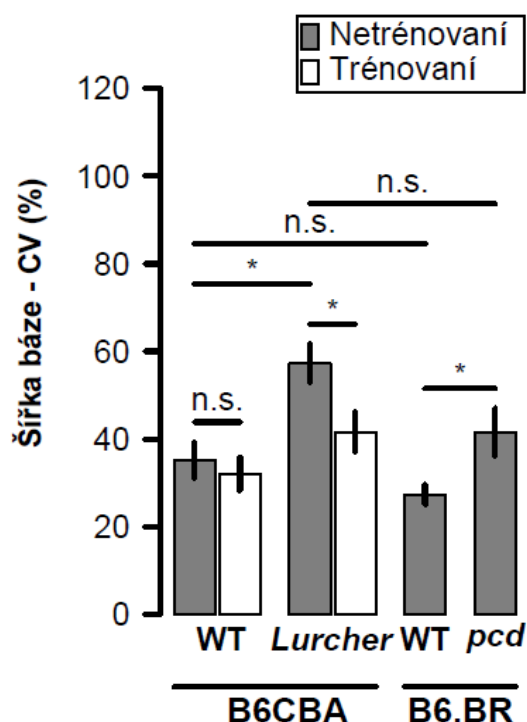
Obr. 32: Úhel nohy předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



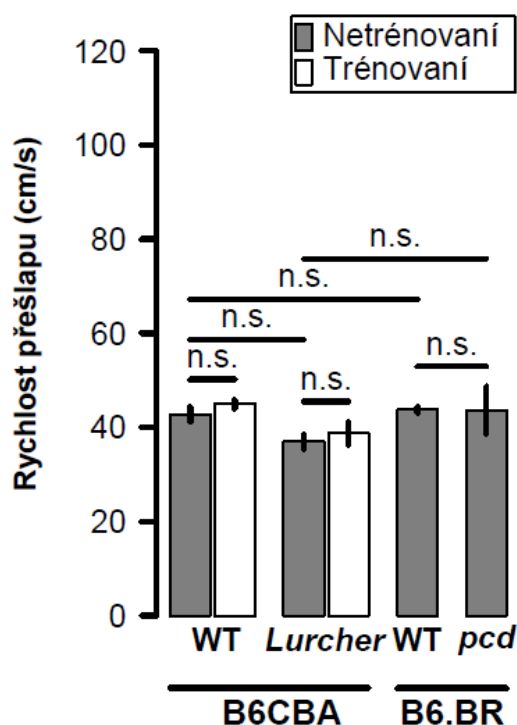
Obr. 33: Variabilita úhlu nohy předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



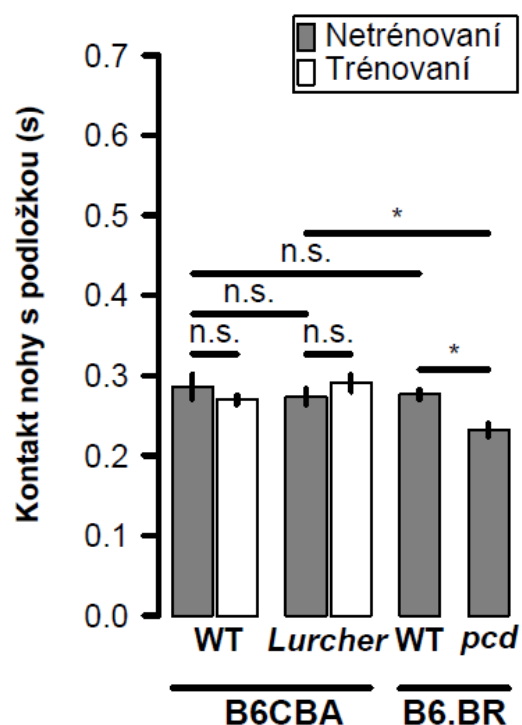
Obr. 34: Šířka báze předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



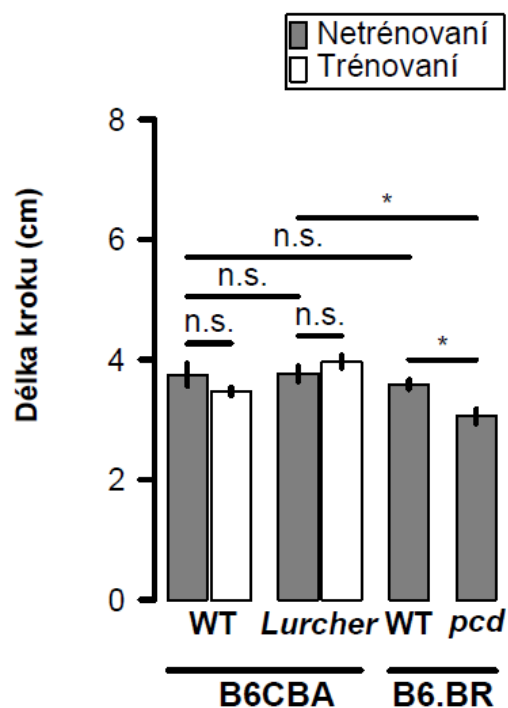
Obr. 35: Variační koeficient šířky báze předních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



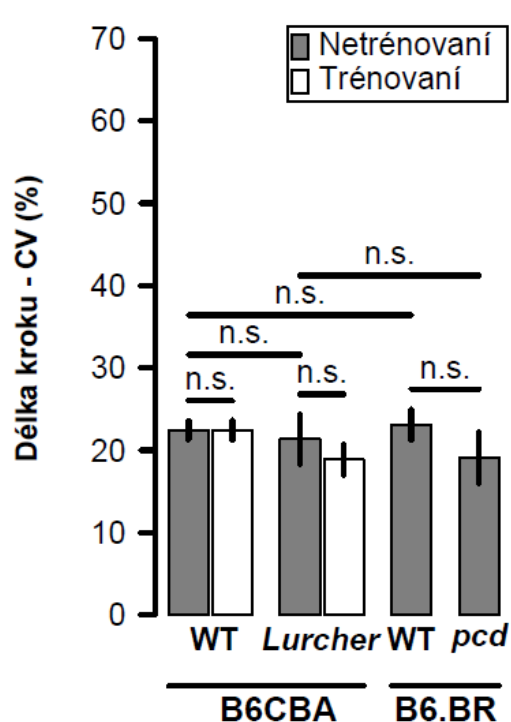
Obr. 36: Rychlost přešlapu zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



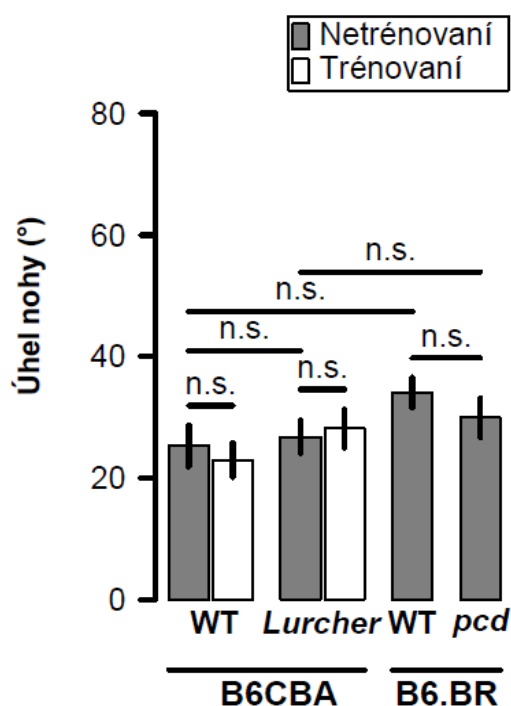
Obr. 37: Doba kontaktu zadních končetin s podložkou u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



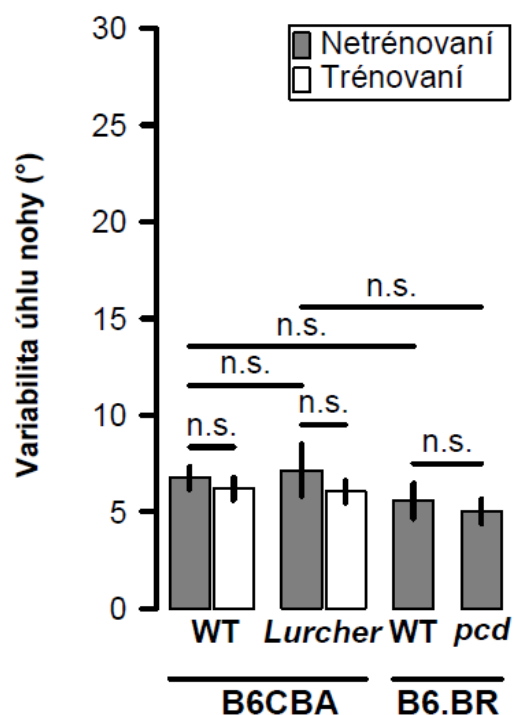
Obr. 38: Délka kroku zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



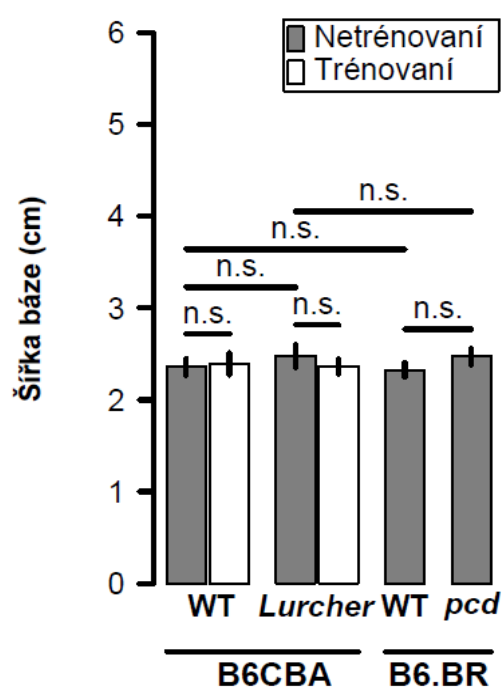
Obr. 39: Variační koeficient délky kroku zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



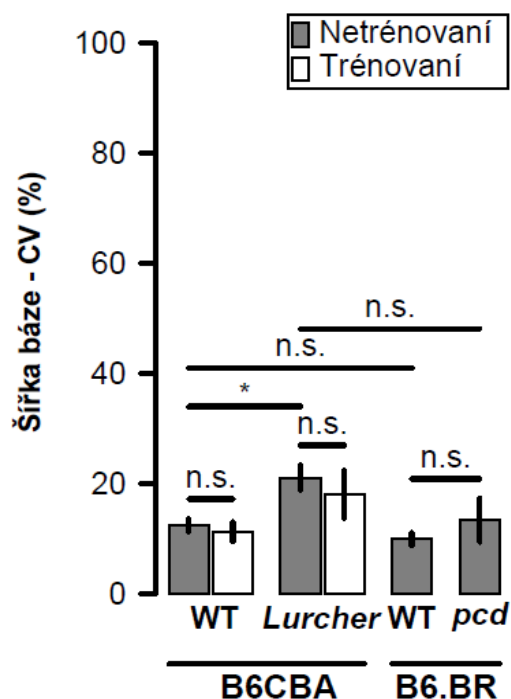
Obr. 40: Úhel nohy zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



Obr. 41: Variabilita úhlu nohy zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



Obr. 42: Šířka báze zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.



Obr. 43: Variační koeficient šířky báze zadních končetin u jednotlivých skupin myší ve věku 6 měsíců. Měřeno přístrojem DigiGait.

5.3. Výsledky behaviorálních testů a zhodnocení vlivu nucené fyzické aktivity

5.3.1. Test v otevřeném poli

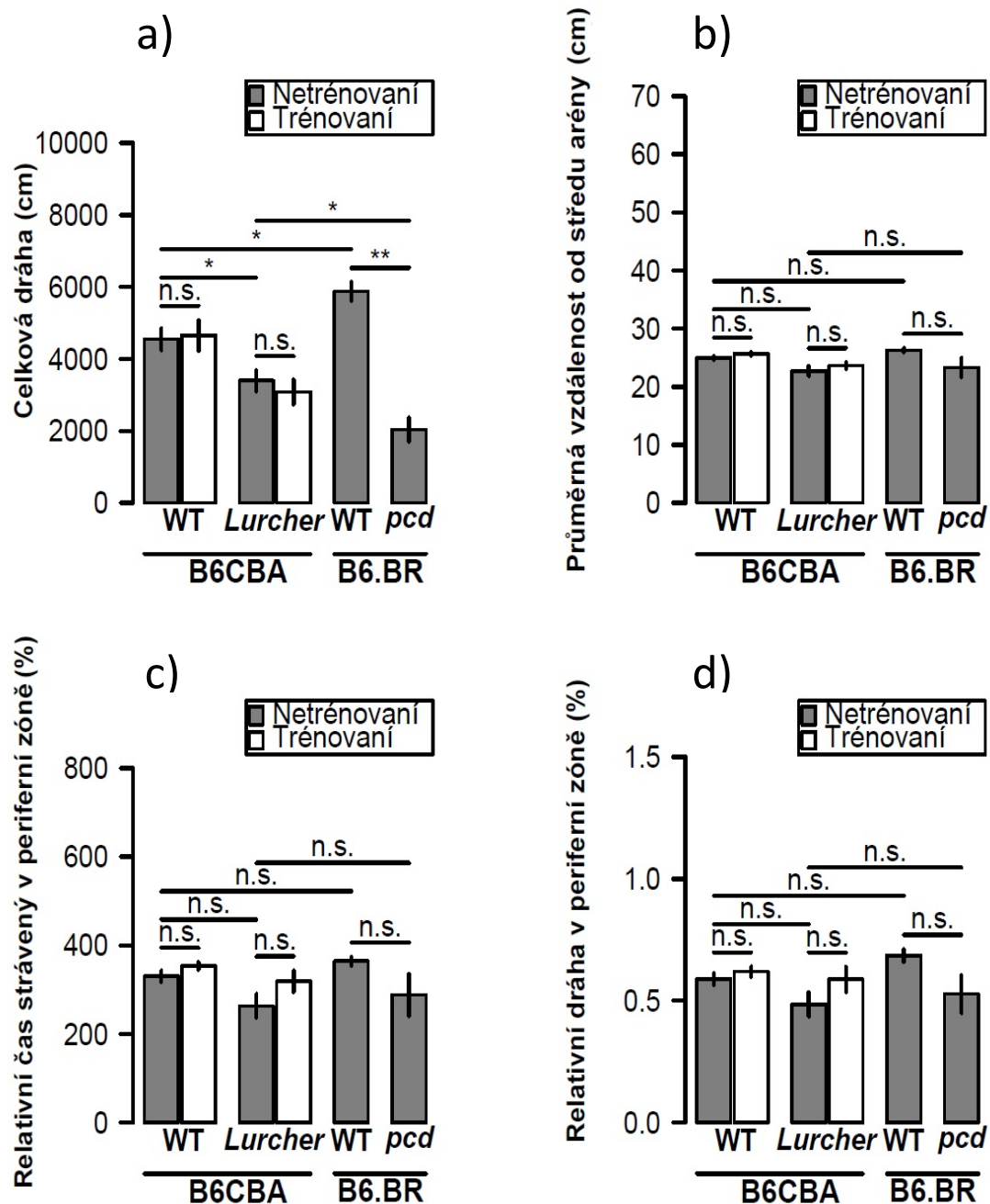
V testu v otevřeném poli byla sledována celková dráha a dráha, kterou myš ušla v periferní zóně. Dále byla měřena průměrná vzdálenost myši od středu arény a relativní čas strávený v periferní zóně. Výsledky testu ANOVA pro jednotlivé parametry jsou uvedeny v tabulce 16.

Tab. 16: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na sledované parametry testu v otevřeném poli. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Parametr	<i>F</i> (5,53)	<i>p</i>
Celková dráha	11,5828	0,0002
Průměrná vzdálenost od středu arény	3,9701	0,0050
Relativní čas v periferní zóně	2,6965	0,0290
Relativní dráha na periférii	2,2199	0,0656

Výsledky z testu v otevřeném poli jsou znázorněny v grafech na obrázku 44. Jediným ze sledovaných parametrů, který prokázal signifikantní rozdíly mezi skupinami myší, byla celková dráha myši (obr. 44 a). Byl zde zjištěn rozdíl vlivem genetického pozadí, přičemž myši typu wild kmene B6.BR ušly delší vzdálenost než myši typu wild kmene B6CBA. Naopak mutanti pcd kmene B6.BR byli nejméně pohybliví a signifikantně se lišili od myší Lurcher kmene B6CBA. Ještě průkaznější byl rozdíl mezi myšmi pcd a jejich zdravými kontrolami. Také myši typu Lurcher se průkazně lišily od svých zdravých kontrol.

Vystavení myší nucené fyzické aktivitě nijak neovlivnilo jejich chování v testu v otevřeném poli.



Obr. 44 a, b, c, d: Výsledky testu v otevřeném poli. Grafy znázorňují celkovou ušlou dráhu (a), průměrnou vzdálenost od středu arény (b) a relativní čas (c) a relativní dráhu (d) myši v periferní zóně arény.

5.3.2. Test rozeznávání nových objektů

V testu pro zjištění schopnosti rozeznávání nových objektů byla kromě celkové dráhy myši věnována pozornost především relativním parametrům vztaženým vždy k novému objektu. Výsledky testu ANOVA pro zkoumané parametry jsou uvedeny v tabulce 17.

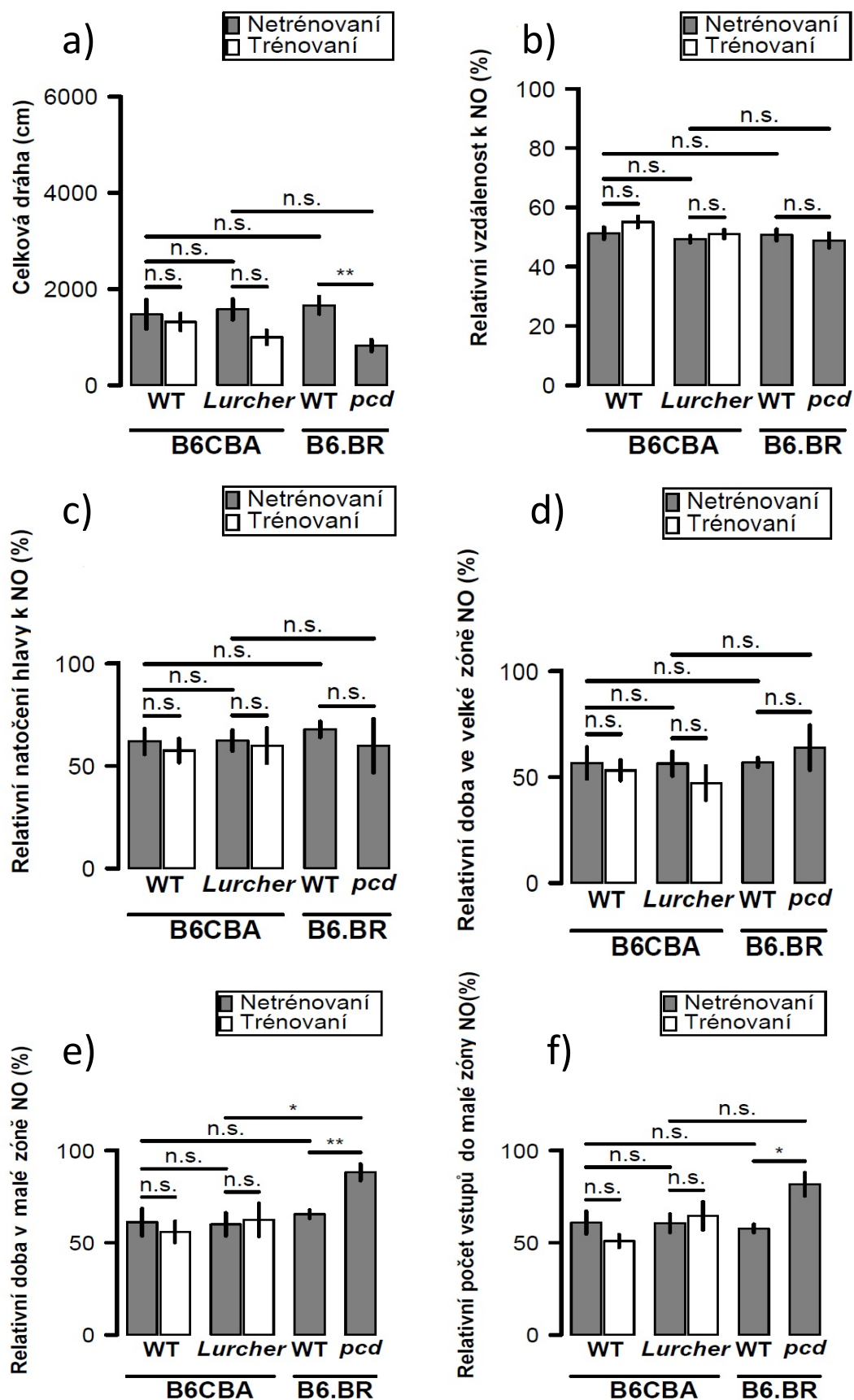
Tab. 17: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na sledované parametry testu rozeznávání nových objektů. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Parametr	<i>F</i> (5,53)	<i>p</i>
Celková dráha	2,0904	0,0743
Relativní vzdálenost k NO	1,6190	0,1836
Relativní natočení hlavy k NO	0,1963	0,9637
Relativní doba v malé zóně NO	1,7755	0,1351
Relativní počet vstupů do malé zóny NO	2,2432	0,0634
Relativní doba ve velké zóně NO	0,5764	0,7149

Celková dráha myši se signifikantně lišila pouze mezi myšmi pcd a jejich zdravými kontrolami (obr. 45 a), to však zřejmě svědčí pouze o celkové snížené pohyblivosti myši typu pcd. Relativní vzdálenost k novému objektu (obr. 45 b), relativní natočení hlavy směrem k novému objektu (obr. 45 c) a relativní doba strávená ve velké zóně nového objektu (obr. 45 d) nepřinesla žádné významné rozdíly mezi skupinami. Všechny skupiny setrvaly přibližně ve stejné vzdálenosti k novému i starému objektu. Všechny skupiny myši vyjma trénovaných myší Lurcher trávily delší čas ve velké zóně nového objektu než ve velké zóně starého objektu.

Relativní natočení hlavy směrem k novému objektu bylo u všech skupin myši vyšší než relativní natočení hlavy směrem ke starému objektu, což může svědčit o větším zájmu myši o nový objekt. Relativní doba strávená v malé zóně nového objektu se výrazně lišila mezi myšmi pcd a s nimi porovnávanými skupinami (obr. 45 e).

Rozdíl mezi myšmi pcd a zdravými myšmi téhož kmene byl nalezen i u parametru relativní počet vstupů do malé zóny nového objektu (obr. 45 f). Lze tedy vyvodit větší zájem myši pcd o nový objekt.



Obr. 45 a, b, c, d, e, f: Výsledky z testu rozeznávání nových objektů. Grafy znázorňují celkovou ušlou dráhu (a), relativní vzdálenost k NO (b), relativní natočení hlavy k NO (c), relativní dobu strávenou ve velké (d) a malé (e) zóně NO a relativní počet vstupů do malé zóny NO (f).

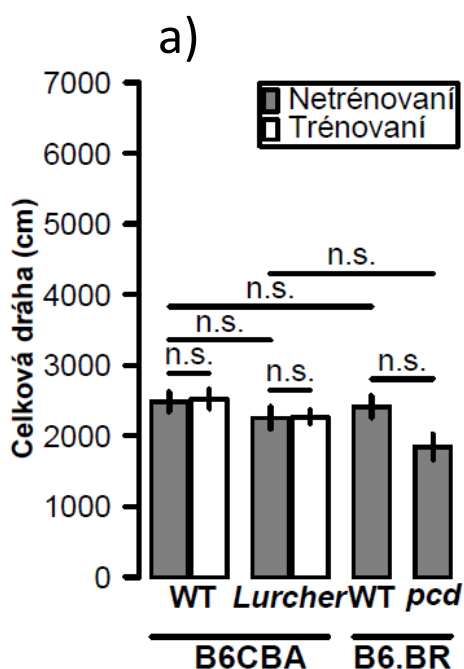
5.3.3. Vyvýšené křížové bludiště

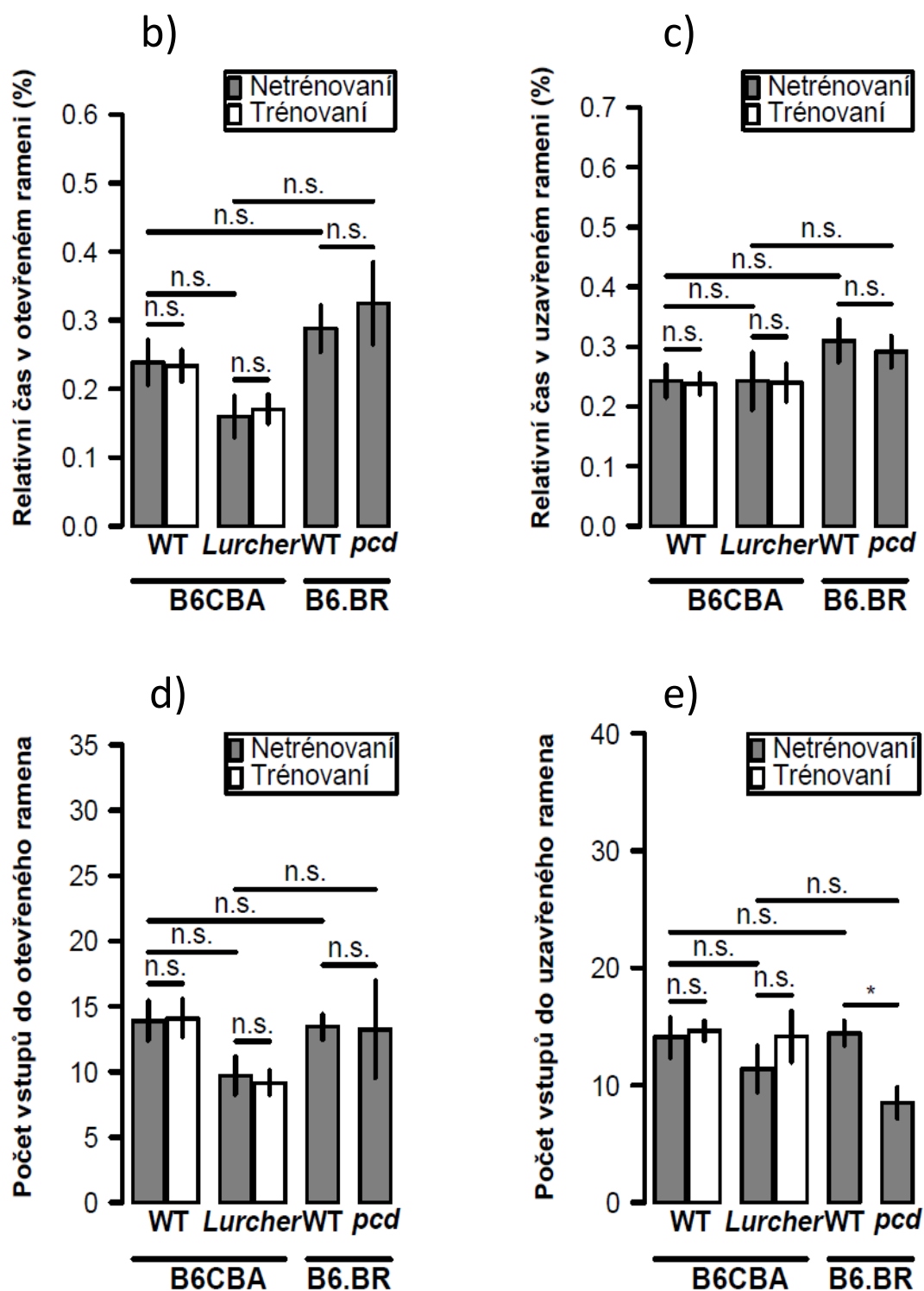
Míra anxiety byla studována pomocí vyvýšeného křížového bludiště. Výsledky ANOVA testu pro jednotlivé parametry jsou uvedeny v tabulce 18.

Tab. 18: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na sledované parametry testu na vyvýšeném křížovém bludišti. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Parametr	$F_{(5,52)}$	p
Celková dráha	1,7637	0,1312
Relativní čas v otevřeném rameni	3,6320	0,0078
Relativní čas v uzavřeném rameni	0,7565	0,5889
Počet vstupů do otevřeného ramena	2,7330	0,0278
Počet vstupů do uzavřeného ramena	1,1418	0,3541

Z vyhodnocení pěti sledovaných parametrů nevyplývaly žádné signifikantní rozdíly v míře úzkostnosti mezi jednotlivými skupinami myší. Celková dráha (obr. 46 a), relativní čas strávený v otevřeném (obr. 46 b), resp. uzavřeném rameni (obr. 46 c) a počet vstupů do otevřeného ramene (obr. 46 d) se u jednotlivých skupin výrazně nelišil. Jediným rozdílem, který lze zhodnotit jako signifikantní, je rozdíl v počtu vstupů do uzavřeného ramene mezi myši typu pcd a wild kmene B6.BR (obr. 46 e). Z analýzy dat byly vyloučeny myši, které z vyvýšeného bludiště spadly. Jednalo se o 2 myši ze skupiny B6.BR_pcd_netřénování a jednu myš ze skupiny B6CBA_Lc_netřénování.





Obr. 46 a, b, c, d, e: Výsledky z testu na vyvýšeném křížovém bludišti. Grafy znázorňují celkovou ušlou dráhu (a), relativní čas strávený v otevřeném (b) a uzavřeném (c) rameni a počet vstupů do otevřeného (d) a uzavřeného (e) ramena.

5.3.4. Akustická úleková reakce a prepulsní inhibice

Ze zpracování dat byla vyřazena data myší, u nichž neproběhla žádná reakce na akustický podnět, a myší, kterým se podařilo během experimentu opustit kapsli, v níž byly umístěny. Úplně byly vyřazeny všechny myši kmene B6.BR, pro statistické zpracování nebyl dostatek vhodných záznamů. Počet použitých myší zastoupených v příslušných skupinách je uveden v tabulce 19. V tabulce 20 jsou uvedeny výsledky testu ANOVA pro hodnocené parametry.

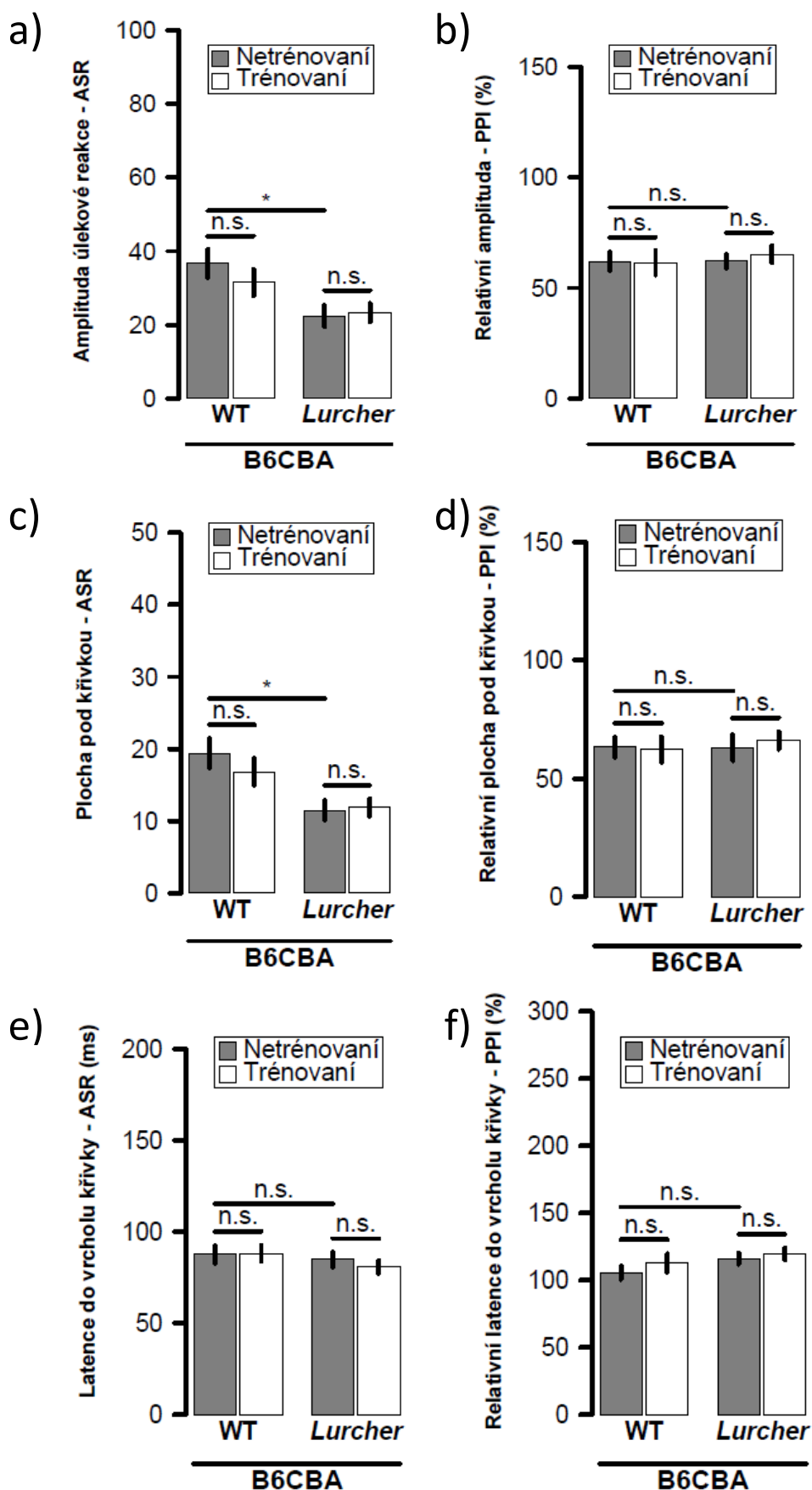
Tab. 19: Zastoupení myší v experimentálních skupinách u vyšetření ASR a PPI, které byly zahrnuty do statistického zpracování.

kmen	genotyp	ovlivnění	celkem
B6CBA	Lc	netrénování	9
B6CBA	Lc	trénování	10
B6CBA	WT	netrénování	10
B6CBA	WT	trénování	11

Tab. 20: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na sledované parametry v testu akustické úlekové reakce a prepulsní inhibice. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Parametr	$F_{(3,36)}$	p
Amplituda úlekové reakce - ASR	4,0599	0,0140
Relativní amplituda - PPI	0,1467	0,9320
Plocha pod křivkou - ASR	4,9940	0,0068
Relativní plocha pod křivkou - PPI	0,1240	0,9486
Latence do vrcholu křivky - ASR	0,6220	0,6207
Relativní latence do vrcholu křivky - PPI	1,1992	0,3287

Test akustické úlekové reakce přinesl významné rozdíly v amplitudě (obr. 47 a) a ploše pod křivkou (obr. 47 c) u myší Lurcher a wild téhož kmene. Vliv fyzického tréninku nebyl zaznamenán v žádném z hodnocených parametrů. U prepulsní inhibice došlo ke snížení reakce na podnět u zdravých i mutovaných myší, nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami (obr. 47 b, d). Latence do vrcholu křivky se mezi skupinami myší signifikantně nelišila (obr. 47 e), u prepulsní inhibice se u všech hodnocených skupin myší mírně prodloužila (obr. 47 f).



Obr. 47 a, b, c, d, e, f: Výsledky z testu akustické úlekové reakce a prepulsní inhibice. Grafy znázorňují amplitudu úlekové reakce (a), plochu pod křivkou úlekové reakce (c), latenci do vrcholu křivky úlekové reakce (e) a relativní hodnoty těchto parametrů u PPI (b, d, f).

5.3.5. Test nuceného plavání

Trvání experimentu bylo rozděleno do dvou časových úseků. Hodnocena byla relativní nepohyblivost v jednotlivých časových úsecích zvlášť a posléze i relativní nepohyblivost během celého experimentu.

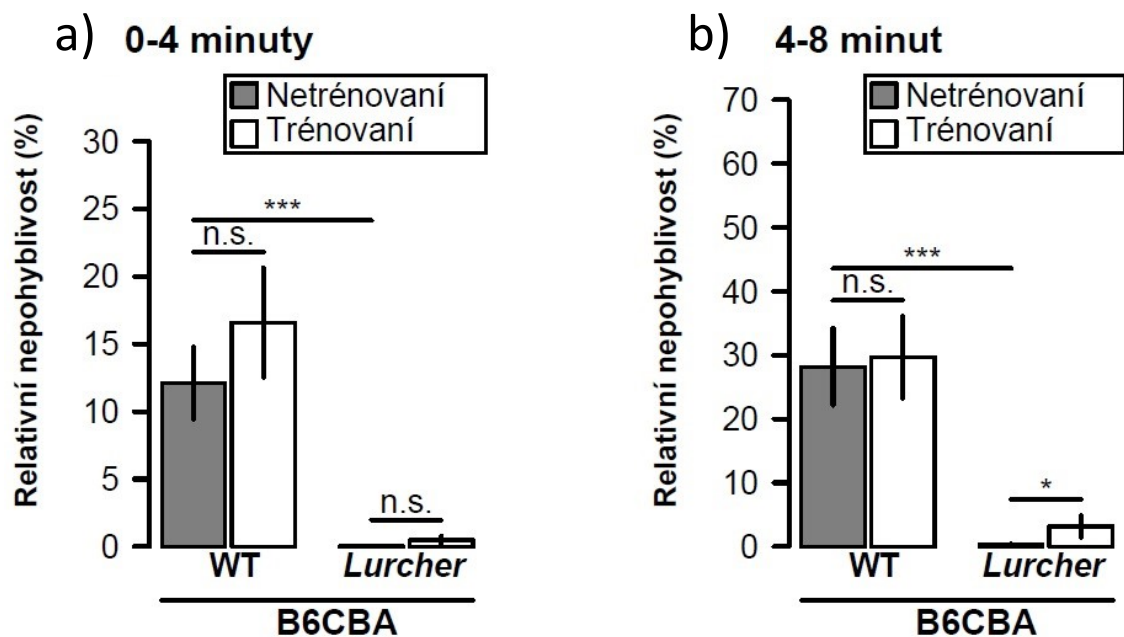
Kvůli špatné fyzické kondici některých myší typu pcd bylo nutno ukončit jejich testování dříve. Pro nedostatečně početný vzorek myší pcd nebyly do statistického zpracování zahrnuty výsledky myší pcd ani jejich zdravých kontrol, se kterými měly být srovnávány.

Výsledky testu ANOVA jsou uvedeny v tabulce 21.

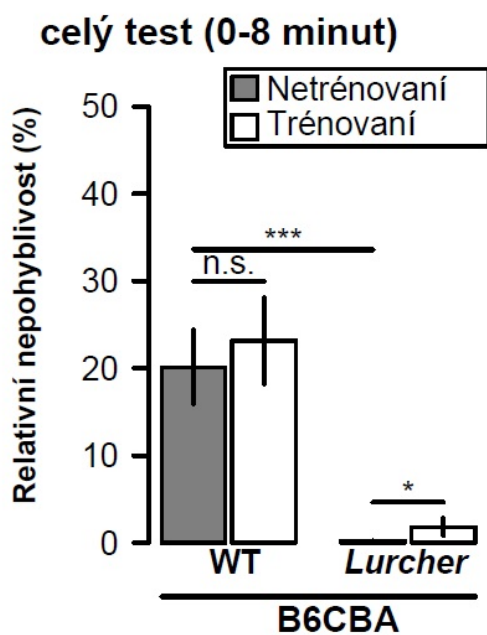
Tab. 21: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na relativní dobu nepohyblivosti v daných časových intervalech testu nuceného plavání. Tučně jsou zvýrazněny statistické signifikance ($p < 0,05$).

Parametr	$F_{(3,42)}$	p
Relativní nepohyblivost v 0. - 4. min	12,6765	0,0004
Relativní nepohyblivost v 4. - 8. min	12,9970	0,0002
Relativní nepohyblivost v 0. - 8. min	14,0989	0,0006

V prvním úseku (0 - 4 minuty) byly patrné pouze rozdíly mezi myšmi Lurcher a jejich zdravými kontrolami, přičemž myši Lurcher měly výrazně sníženou hodnotu relativní nepohyblivosti (obr. 48 a). Ve druhém úseku (4 - 8 minut) byl mimo to patrný i vliv tréninku. Trénované myši Lurcher strávily delší čas pokusu v nehybném stavu oproti myším netrénovaným (obr. 48 b). Tento rozdíl se projevil i ve zhodnocení celého časového úseku (0 - 8 minut) jako signifikantní (obr. 49). U zdravých myší kmene B6CBA se vliv nucené fyzické aktivity neprojevil signifikantně.



Obr. 48 a, b: Relativní nepohyblivost myši v testu nuceného plavání v časových úsecích 0 – 4 minuty (a) a 4 – 8 minut (b).



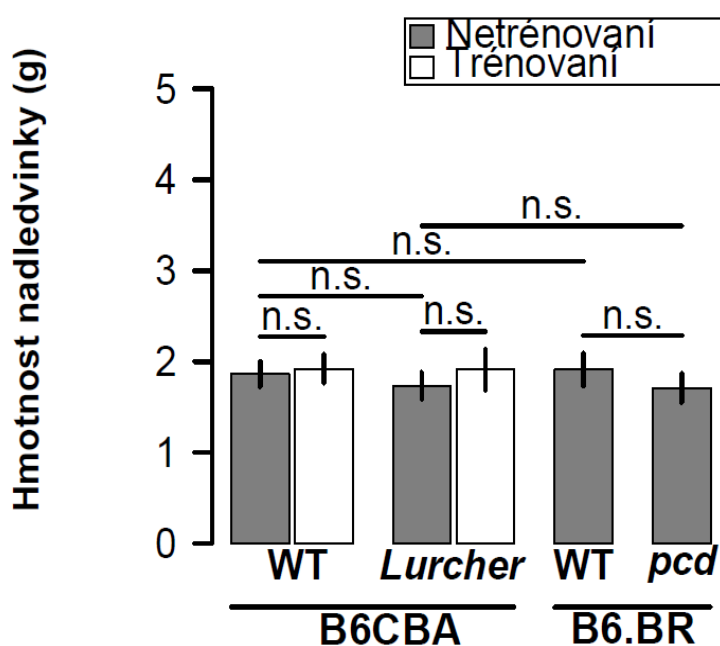
Obr. 49: Relativní nepohyblivost myši v testu nuceného plavání během celého experimentu.

5.4. Měření hmotnosti nadledvin

Pro zjištění, zda byly jednotlivé skupiny myší, které prošly definovanou sérií testů, více či méně chronicky stresovány, došlo po jejich usmrcení k odběru nadledvin. Průměrné hmotnosti levé a pravé nadledviny byly porovnávány mezi skupinami myší. Výsledky testu ANOVA jsou uvedeny v tabulce 22. Mezi jednotlivými skupinami myší však v hmotnostech nadledvin nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly (obr. 50).

Tab. 22: Výsledky testu jednoduchá ANOVA popisujícího vliv experimentální skupiny na hmotnost nadledvin.

Parametr	$F_{(5,53)}$	p
Hmotnost nadledviny	0.2463	0.9378



Obr. 50: Průměrné hmotnosti nadledvin u jednotlivých skupin myší.

6. DISKUSE

V této studii byly sledovány motorické schopnosti myší s cerebelární degenerací a kontrolních zvířat odpovídajícího kmene a věku během ontogeneze. Pomocí systému CatWalk byla kvantitativně analyzována chůze jedinců typu Lurcher a wild a pomocí klasické metody, rotarodu, byly hodnoceny motorické dovednosti myší Lurcher, pcd a příslušných zdravých kontrol. Dále pak byl zjišťován účinek nucené fyzické aktivity na změny chůze - pomocí přístrojů CatWalk a DigiGait, na motorické schopnosti na rotarodu a na behaviorální aktivitu, sledovanou obvyklými behaviorálními testy – test v otevřeném poli, test rozeznávání nových objektů, vyvýšené křížové bludiště, test akustické úlekové reakce a prepulsní inhibice a test nuceného plavání.

6.1. Kvantitativní analýza chůze v průběhu ontogeneze

Kvantitativní analýza chůze v průběhu ontogeneze byla prováděna pomocí systému CatWalk. Mnohé parametry, které vykazují zásadní rozdíl v chůzi mutantních myší oproti zdravým, se odvíjejí od rychlosti chůze a jsou jí více či méně ovlivněny. Míra vzájemných korelací jednotlivých parametrů je uvedena v příloze 1 a 2. Za účelem snížení počtu hodnocených parametrů nebyly do statistického zpracování vlivu ontogeneze zahrnuty parametry, které nejvíce korelovaly s rychlostí (kontakt nohy s podložkou, rychlost přešlapu a délka kroku), a jejichž srovnání tedy nepřináší další podstatné informace. Použity byly pouze variační koeficienty těchto parametrů, které jsou na rychlosti nezávislé.

Většina hodnot sledovaných parametrů se v průběhu ontogeneze téměř nezměnila. Hodnoty variačních koeficientů vybraných parametrů jsou u všech myší typu wild velmi vyrovnané a daleko nižší než u myší typu Lurcher. Vysoké variační koeficienty u myší Lurcher svědčí o velké variabilitě jednotlivých parametrů v průběhu jednoho přeběhu, tedy vysoké intraindividuální variabilitě a nepravidelnosti chůze. Navíc vysoké směrodatné odchylky souboru myší Lurcher jako celku svědčí i o značné interindividuální variabilitě a o individuálním dopadu mutace na každého jedince. Vyšší variabilita chůze mutantů přetrvávala po celou dobu přibližně půlročního sledování.

Mezi prvním a pátým měsícem experimentu byl zjištěn signifikantní rozdíl ve variačním koeficientu kontaktu předních končetin s podložkou u netrénovaných myší Lurcher. Hodnota variačního koeficientu se významně zvýšila, což znamená, že jejich chůze byla s postupem stárnutí stále méně vyrovnaná a stávala se variabilnější. Hodnoty tohoto parametru jsou však od druhého měsíce testování velmi blízké hodnotám myší Lurcher trénovaných, u kterých signifikantní změna během ontogeneze zaznamenána nebyla. Lze tedy soudit, že významnost rozdílu u myší Lurcher netrénovaných byla způsobena nižšími hodnotami tohoto parametru v prvním měsíci testování oproti hodnotám myší Lurcher trénovaných. Vzhledem k tomu, že myši byly vystaveny fyzickému tréninku až po prvním nahrávání záznamů systémem CatWalk, dalo se předpokládat, že myši Lurcher trénované i netrénované budou mít na začátku testování shodné hodnoty. Předpoklad se však vlivem náhodných činitelů zcela nevyplnil, a ačkoliv rozdíl ve zmiňovaném parametru mezi myšmi trénovanými a netrénovanými nebyl u prvního měsíce signifikantní, mohl však ovlivnit signifikanci při srovnávání hodnot prvního a pátého měsíce u jednotlivých skupin. Myši, které měly být zatíženy nucenou fyzickou aktivitou, byly vybírány náhodně, nejlépe však tak, aby z jednoho hnízda pocházely myši trénované i netrénované, aby nedošlo k nežádoucímu vlivu genetických presumpcí.

Všechny sledované parametry, vyjma šířky báze předních a zadních končetin a vzdálenosti došlapu předních a zadních končetin, ukázaly v průběhu celého sledování ontogeneze významné rozdíly mezi mutanty a jejich kontrolami. Jedním z nejvýznamnějších parametrů, které ukazují rozdíl mezi myšmi Lurcher a zdravými myšmi téhož kmene je rychlost spontánní chůze, přičemž mutanti díky své ataxii nedosahují ani poloviny rychlosti zdravých myší.

6.2. Kvantitativní analýza chůze u šestiměsíčních myší

Jak již vyplynulo z části experimentu sledujícího vývoj chůze, zásadní parametry, kterými se myši Lurcher a wild type podle systému CatWalk navzájem odlišují, jsou úzce závislé na rychlosti chůze. Myši Lurcher mají významně delší kontakt nohy s podložkou, což mimo nižší rychlosti chůze může poukazovat na zhoršenou schopnost

udržování rovnováhy. Prodlužování fáze kontaktu nohy s podložkou je zmiňováno v souvislosti s výzkumem poranění míchy (Kloos et al., 2005) a u modelu Parkinsonovy choroby podle Westina (Westin et al., 2012), tedy patologií zcela jiného charakteru, než jaká postihuje myši Lurcher a pcd. Zhoršená schopnost udržovat rovnováhu se projevila též v parametru udávajícím relativní čas, kdy je v kontaktu s podložkou určitá kombinace nohou. Kromě diagonálního postavení dvou nohou volí myši Lurcher i laterální postavení nebo podporu třech či dokonce čtyřech nohou. Tento způsob zajištění opory těla poskytuje větší stabilitu v situaci, kdy je kontrola udržování postoje narušena dysfunkcí mozečku. K lepšímu udržování stability napomáhá také větší šířka báze končetin. Zatímco dosavadní studie pomocí CatWalk poukazovaly u myší Lurcher spíše na větší šířku báze u zadních končetin (Cendelín et al., 2010), tato práce zaznamenala signifikantní zvětšení šířky báze u předních končetin. Podle výsledků z přístroje DigiGait nedošlo k rozšíření báze myší Lurcher u předních ani zadních končetin a signifikantně se lišil pouze variační koeficient tohoto parametru.

U myší Lurcher došlo ke zkrácení délky kroku, což mělo podstatný vliv na vzdálenost došlapu předních a zadních končetin. Myši Lurcher měly podle výsledků signifikantně větší vzdálenost došlapu než zdravé myši. Toto zjištění se neshoduje s dosavadními poznatky, které v tomto parametru rozdíl u myší Lurcher a wild nezaznamenaly (Cendelín et al., 2010). Dalším podstatným rozdílem v chůzi mutantních a zdravých myší byl vzorec chůze. Nejobvyklejšími vzorci chůze u všech skupin myší byly vzorce střídavý a křížový. Mutantní myši však často používaly i vzorec rotační či úplně nepravidelnou chůzi, čímž se významně lišily od svých zdravých kontrol. I tento jev zapadá do obrazu celkově nepravidelné chůze myší s mozečkovou degenerací.

Systém DigiGait eliminoval veškeré rozdíly v parametrech chůze, které korelovaly s rychlostí. Kromě zmíněného variačního koeficientu šířky báze předních a zadních končetin nebyly odhaleny žádné zásadní rozdíly mezi mutanty Lurcher a zdravými myšmi. To je zcela překvapující zjištění, poněvadž rozdíly v chůzi jsou patrné pouhým okem. Stejných výsledků dosáhli ve své práci Cendelín et al., (2010), kteří tento rozpor přisuzují postupu při nahrávání a výběru záznamů. Jako vhodné jsou totiž vybírány záznamy s plynulou rovnoměrnou chůzí, bez zastavování, váhání a změn směru. To vede k filtrování motorických projevů, které jsou pro cerebelární ataxii

typické – titubace, pro-, retro-, lateropulse. Cendelín et al., (2010) formulovali hypotézu, že hlavním motorickým projevem cerebelární degenerace u myši jsou právě zmíněné titubace, pro-, retro- a lateropulse a koordinace pohybů končetin je postižena méně.

6.3. Porovnání přístrojů CatWalk a DigiGait

Pro vyšetření parametrů chůze byly použity dva rozdílné přístupy. Systém CatWalk umožňoval kvantifikaci spontánní chůze po statické podlaze, zatímco systém DigiGait vnutil pomocí běžícího pásu myšim definovanou rychlost. Oba přístupy mají určité výhody a nevýhody. Většina parametrů systému CatWalk u spontánní chůze je závislá na rychlosti, a tedy nestandardizovaná. Přístroj DigiGait se v tomto ohledu jeví příznivěji, protože eliminuje rychlostní rozdíly. Avšak chůze již není spontánní a nelze ji označit za zcela přirozený pohybový vzorec. Zatímco u přístroje CatWalk se významně lišily hodnoty většiny parametrů chůze mezi mutantními a zdravými myšmi, přístroj DigiGait tyto signifikantní rozdíly nezaznamenal. Shodné parametry měřené oběma přístroji, avšak závislé na rychlosti chůze, nemá cenu porovnávat.

Jediným parametrem, shodným pro oba přístroje a zároveň s minimální závislostí na rychlosti chůze, je šířka báze předních a zadních končetin. Hodnoty šířky báze myši Lurcher byly u obou přístrojů stejné, avšak u myši typu wild byly zaznamenány mírně širší báze předních i zadních končetin u přístroje DigiGait. To lze zřejmě vysvětlit sníženou jistotou chůze myši po pohybujícím se pásu.

Přístroj DigiGait má navíc některá úskalí, která významně ovlivňují nahrávání a analýzu záznamů chůze. Shodné nastavení rychlosti pásu pro všechny myši se nejeví jako ideální. Motorické dovednosti každé myši jsou různé. Některým rychlost 10 cm/s vyhovuje, ale některé myši typu Lurcher nebo pcd tuto rychlost zvládají vždy jen na velice krátký okamžik nebo dokonce nezvládají vůbec. Ojediněle se najde i myš, pro kterou je nucená chůze po pásu takovým stresem, který spouští prvky chování zcela znemožňující pořízení hodnotitelného záznamu (výskoky, pasivní sunutí přepážkou). Naopak pro některé myši typu wild je tato rychlost příliš nízká a nedovoluje jim přirozeně se rozběhnout. Musí často zastavovat a čekat, až pás popojede, proto je jejich běh nerovnoměrný, a tedy i špatně analyzovatelný.

Dalším problémem tohoto přístroje je nemožnost manuální opravy při analýze jednotlivých tlapek. Program určuje jednotlivé otisky tlapek automaticky, ale zřejmě nepočítá s tak výraznou ataxií, jakou trpí myši Lurcher a pcd, a často zaměňuje označení končetin mezi sebou nebo s čenichem. Tytéž problémy s analýzou se však vyskytují i u myší typu wild, které v důsledku nízké rychlosti pásu chodí nerovnoměrně a nepřímochaře. Použity mohly tedy být jen ty záznamy, které nebyly ovlivněny analyzačními chybami.

6.4. Posouzení motorických dovedností na rotarodu v průběhu ontogeneze

Hodnoty latence pádu v testu na rotarodu byly v rámci jednotlivých skupin myší v průběhu pěti měsíců experimentu velmi vyrovnané. Nebylo prokázáno žádné významné zlepšení mutantních myší vlivem dlouhodobého motorického učení mezi jednotlivými měsíci, avšak nedošlo ani k výraznému zhoršení vlivem progresu onemocnění, sekundárních změn nebo stárnutí. To je zřejmě způsobeno tím, že myši Lurcher od začátku testování podávaly tak chabé výkony, že už nebylo, kam se zhoršovat, jak uvádějí Hilber a Caston (Hilber & Caston, 2001). U myší pcd však prokazatelné zhoršení mezi prvním a pátým měsícem experimentu zaznamenáno bylo. Kvalita výkonů myší pcd na rotarodu byla na začátku testování nevýznamně vyšší než u myší Lurcher. V průběhu pětíměsíčního experimentu se výkony myší pcd, patrně vlivem jejich celkově špatné a stále se zhoršující fyzické kondice během stárnutí, signifikantně zhoršovaly. U starších myší pcd je uváděno zhoršené zdraví, úbytek na hmotnosti a snížená aktivita (Mullen et al., 1976), což odpovídá našim pozorováním. Rovněž měření svalové síly vyhodnotilo myši pcd jako jednoznačně nejslabší skupinu.

Účinek krátkodobého učení na rotarodu (mezi prvním a třetím dnem) byl patrný u trénovaných a netrénovaných myší typu wild kmene B6CBA v prvním měsíci. U ostatních skupin myší nedošlo k výraznému prodloužení latence na rotarodu mezi prvním a třetím měřením. To svědčí o jejich výrazně snížené (nikoliv však nulové) schopnosti motorického učení, která je limitována stupněm obtížnosti úlohy (Caston et al., 1995).

Měření svalové síly během ontogeneze přineslo zajímavé zjištění u skupiny netrénovaných myší Lurcher, které se v prvním a druhém měsíci významně lišily od svých zdravých kontrol. Od třetího měsíce však již nikoliv. Může to znamenat určitý směr ke zlepšení této skupiny během ontogeneze, případně poukazovat na zpomalení somatického vývoje a tedy pozdější dosažení plné tělesné zdatnosti.

6.5. Vliv nucené fyzické aktivity na motorické projevy myší

Pozitivní vliv fyzické aktivity byl zaznamenán v souvislosti se zlepšením kognitivních funkcí, paměti a učení (Fordyce & Wehner, 1993; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). Zvýšenou fyzickou aktivitou se zesiluje synaptická plasticita a LTP (Patterson et al., 1992; Vaynman et al., 2006) a může sloužit jako podpůrný prostředek terapie u pacientů s neurologickými obtížemi. Tato práce se zabývala vlivem fyzické aktivity na motorické a behaviorální projevy myší s cerebelární degenerací.

Výsledky kvantitativní analýzy chůze pomocí systému CatWalk nevykazují žádný vliv nucené fyzické aktivity na změny chůze. V žádném ze sledovaných parametrů nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi trénovanými a netrénovanými myšmi typu Lurcher ani mezi trénovanými a netrénovanými myšmi typu wild. Systém DigiGait však odhalil signifikantní změnu u trénovaných myší Lurcher oproti netrénovaným myším Lurcher ve variačním koeficientu šířky báze u předních končetin. Hodnota tohoto parametru byla u trénovaných myší podstatně nižší a výrazně se přiblížila hodnotám myší typu wild. Toto zlepšení vlivem tréninku se však projevilo pouze u chůze s vnucenou rychlostí, kterou umožňuje přístroj DigiGait. Přirozená chůze na skleněné desce CatWalk tento náález nepotvrdila.

Vzhledem k tomu, že variační koeficient šířky báze u předních končetin je jediným parametrem, u kterého byl shledán rozdíl v chůzi u trénovaných a netrénovaných myší a ani vyšetření na rotarodu neukázalo žádná prokazatelná zlepšení motorických dovedností myší, které byly vystaveny fyzickému tréninku, nelze usuzovat o žádném příznivém vlivu takto nastavené nucené fyzické aktivity na změny motoriky.

Myši byly nucené fyzické aktivitě vystaveny spíše v dlouhodobém měřítku (denně vždy 1 týden v měsíci po dobu čtyř měsíců) a intenzita tréninku nebyla příliš vysoká. Není však vyloučeno, že se zvýšením intenzity nucené fyzické aktivity dosáhne požadovaných výsledků a motorické schopnosti myší se tréninkem skutečnělepší.

6.6. Vliv nucené fyzické aktivity na behaviorální projevy myší

Nastavená intenzita nucené fyzické aktivity neměla příznivý účinek ani na změny chování ve většině klasických behaviorálních testů. U mnohých testů nebyly dokonce zaznamenány ani odchylky mezi myšmi zdravými a mutanty, ačkoliv mnohé zdroje uvádějí změněné emocionální chování u těchto mutantů – nižší úroveň anxiety na vyvýšeném křížovém bludišti (Monnier & Lalonde, 1995; Hilber et al., 2004) a větší tendence prozkoumávat celou arénu testu v otevřeném poli (Tůma et al., 2015). K zmírnění rozdílů emocionality u mutantních myší a jejich kontrol mohlo dojít patrně vlivem nastavení celého cyklu pokusů. Chování myší v behaviorálních testech mohly ovlivnit zkušenosti s předchozími motorickými testy a vyšetřováním chůze a v podstatě habituace na opakovanou manipulaci. Navrhujeme proto v dalších studiích zařadit srovnání se skupinou myší, s níž by až do doby behaviorálního testování nebylo manipulováno s výjimkou běžné péče.

Rozhodně nejvýznamnější zjištění o vlivu tréninku přinesl test nuceného plavání. Myši Lurcher mají oproti svým kontrolám výrazně potlačené depresivní chování. Nižší imobilita u mutantů Lurcher byla zaznamenána ve shodě s dřívějšími studiemi (Vogel et al., 2007; Tůma et al., 2015). U myší Lurcher se dá jejich snížená imobilita v tomto testu považovat i za projev behaviorální disinhibice. Myši Lurcher nejsou schopny inhibovat svou aktivitu spuštěnou vložím do vodního prostředí a pokračují v plavání, ačkoliv je jejich snažení zjevně bezúčelné (Hilber et al. 2004; Porras-García et al., 2005; Lorivel & Hilber 2006; Lorivel et al., 2014).

Trénovaní jedinci Lurcher však měli imobilitu signifikantně zvýšenou. Zatímco relativní nepohyblivost v 0. – 4. minutě experimentu se u trénovaných a netrénovaných myší nelišila, relativní nepohyblivost ve 4. – 8. minutě se u myší Lurcher vystavených nucené fyzické aktivitě signifikantně zvýšila oproti myším bez tréninku a

svou hodnotou se přiblížila k hodnotám zdravých myší. Signifikantní rozdíl trénovaných a netrénovaných myší typu Lurcher se projevil i ve zhodnocení celého časového úseku experimentu (0 - 8 minut). Vliv tréninku se u myší typu Lurcher projevil jako zvýšení míry depresivního chování nebo snížení projevu behaviorální disinhibice.

Test v otevřeném poli neodhalil žádné signifikantní rozdíly mezi myšmi trénovanými a netrénovanými. Ve většině parametrů se výsledky nelišily ani mezi mutantními myšmi a jejich zdravými kontrolami. Jediným parametrem, u kterého se objevily signifikantní rozdíly mezi skupinami, byla celková dráha, kterou myš v aréně ušla. Rozdíly jsou však patrně zapříčiněny spíše celkovou schopností pohybu jednotlivých skupin myší, nikoliv tím, že by u nich došlo k nějakým výrazným změnám emocionality. To potvrdily i výsledky z testování na vyvýšeném křížovém bludišti. U kmene B6CBA se nelišily výsledky trénovaných myší od netrénovaných, ani výsledky jednotlivých skupin mezi sebou. Úroveň anxiety myší Lurcher tedy podle tohoto testu odpovídala úrovni anxiety příslušných kontrol.

Zdá se však, že myši pcd mají oproti svým kontrolám úroveň anxiety mírně potlačenou. Rozdíl v počtu vstupů do uzavřeného ramene byl u nich vyhodnocen jako signifikantní, přičemž myši pcd vyhledávaly bezpečí uzavřeného ramene podstatně méně. Důležité je, že myši pcd se nejvíce ze všech skupin, nikoliv však signifikantně, vyskytovaly v otevřeném rameni. Nedbaly na možné nebezpečí pádu z ramene bludiště a dvě myši pcd skutečně spadly. Jejich záznamy byly tudíž ze statistického zpracování pro možné ovlivnění výsledků vyřazeny.

Z testu rozeznávání nových objektů opět nevzešly signifikantní rozdíly mezi trénovanými a netrénovanými myšmi, dokonce ani mezi myšmi typu Lurcher a wild téhož kmene. Celková dráha se u všech myší oproti testu v otevřeném poli snížila přibližně na polovinu. Myši již neměly vysokou potřebu explorační prostředí a jevily určitý zájem o předměty vložené do arény. Podle předpokladu jevíly myši všech skupin mírně větší zájem o nové předměty než o ty staré. Zájem se však signifikantně lišil oproti jiným skupinám pouze u myší pcd, které strávily v malé zóně nového předmětu podstatně delší relativní dobu než jejich kontroly a i relativní počet vstupů do této zóny byl u nich vyšší. Z výsledků lze vyvodit, že myši pcd zřejmě rozeznaly starý objekt od nového a starému objektu nevěnovaly takovou pozornost jako objektu novému. Jejich výsledky z tohoto testu jsou dokonce lepší než u zdravých myší. Tento fakt je nejspíše

možné přisoudit jejich snížené úrovni anxiety, která byla zjištěna jinými behaviorálními testy. Je možné, že myši ostatních skupin objekt také rozeznaly, ale strach z neznámého podezřelého předmětu u nich byl silnější, než u myší pcd.

Vliv tréninku se neprojevil ani u testování akustické úlekové reakce a prepulsní inhibice. U akustické úlekové reakce byly patrné rozdíly pouze mezi mutantními myšmi Lurcher a jejich zdravými kontrolami. Myši Lurcher měly nižší amplitudu i plochu pod křivkou záznamu úlekové reakce, což je v rozporu s dřívějším nálezem (Porras-García et al., 2005). Velikost odrazu mohla být ovlivněna v důsledku rozdílné průměrné hmotnosti jednotlivých skupin myší. Snížení amplitudy a plochy pod křivkou úlekové reakce u myší Lurcher bylo zřejmě zapříčiněno nižší hmotností těchto myší oproti myším zdravým. Průměrná hmotnost myší Lurcher a zdravých myší, jejichž data byla do statistiky zahrnuta, se v době testování lišila o více než 25 %. Hypotéza, že by myši Lurcher projevovaly nižší strach než jejich kontroly, nebyla v kontextu s výsledky jiných behaviorálních testů potvrzena.

Reakce na podnět (amplituda a plocha pod křivkou úlekové reakce) po předchozím prepulsu u testu prepulsní inhibice byla snížena u všech testovaných skupin myší zhruba o 30 - 40 %. Nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly ve snížení odpovědi po prepulsu mezi mutanty a zdravými myšmi. Toto zjištění je opět v rozporu s dřívějším výzkumem (Porras-García et al., 2005) a lze ho vysvětlit habituací myší při manipulaci s nimi a redukcí stresu z experimentálních podmínek. Stresem indukované behaviorální abnormality tudíž vymizely. Myši Lurcher tedy netrpí žádnými deficity, pod jejichž vlivem by nebyly schopny přizpůsobit se silným smyslovým podnětům, kterým předchází varovný signál. Prepuls měl u všech skupin myší shodný vliv i na dobu latence do vrcholu křivky, která se oproti latenci po samostatném zvukovém podnětu nepatrně prodloužila.

Měření hmotnosti nadledvin nevykazovalo žádné významné rozdíly mezi skupinami. Nedá se tedy usuzovat na rozdílnou intenzitu stresu myší vystavených nebo nevystavených fyzickému tréninku do té míry, že by se projevila hypertrofií nadledvin. Tůma et al., (2017) přitom zjistili větší objem nadledvin u myší Lurcher ve srovnání se zdravými zvířaty. Rovněž v tomto případě by bylo vhodné doplnit hodnocení hmotnosti nadledvin myší nevystavených experimentům.

7. ZÁVĚR

Bylo zjištěno, že mutantní myši s cerebelární degenerací se od svých zdravých kontrol liší především v rychlosti spontánní chůze a v parametrech s ní korelujících. Výskyt méně obvyklých vzorců chůze a kroků zcela se vymykajících jakémukoliv vzorci ukazuje, že základním rysem chůze mozečkových mutantů a hlavním rozdílem oproti zdravým kontrolám je právě intraindividuální variabilita chůze, nikoliv odlišná mechanika pohybu.

Při porovnávání výsledků z přístrojů CatWalk a DigiGait, které fungují na odlišných principech, je rozhodující závislost parametrů na rychlosti chůze. Zatímco u systému CatWalk většina parametrů korelovala s rychlostí chůze, přístroj DigiGait rychlostní rozdíly eliminoval a u většiny parametrů nezaznamenal žádné signifikantní rozdíly ani mezi myšmi mutantními a zdravými.

Prokazatelná změna vlivem ontogeneze byla zaznamenána u výkonu myší pcd na rotarodu. Tato skupina myší se, patrně vlivem postupující degenerace mozečkových buněk a celkově zhoršujícího se fyzického stavu, během pěti měsíců experimentu signifikantně zhoršila. Výkon ostatních skupin myší na rotarodu zůstal v průběhu ontogeneze nezměněn. Téměř nulové zlepšení mutantních myší od jejich první zkušenosti s přístrojem svědčí o výrazně snížené schopnosti motorického učení.

Pozitivní vliv fyzické aktivity byl sledován pouze u testu nuceného plavání, u kterého se hodnoty času stráveného v imobilní pozici významně lišily mezi mutantními myšmi Lurcher trénovanými a netrénovanými. Hodnoty trénovaných myší se více blížily hodnotám myší zdravých. Námi nastavená fyzická aktivita neměla žádný vliv na motorické projevy myší.

Do budoucna by bylo dobré zvýšit intenzitu fyzického tréninku nebo zaměřit pozornost na jiné možnosti podpory nervové plasticity (obohacené prostředí, případně aplikaci trofických faktorů). Již byla nastíněna možnost rozšíření experimentálních skupin o skupinu myší, které neprodělají celý cyklus pokusů, ale do experimentu budou zařazeny až v době behaviorálního testování.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. AHMADIASL, N., ALAEI, H., HANNINEN, O.: Effect of exercise on learning, memory and levels of Epinephrine in rats Hippocampus. *Journal of Sports Science and Medicine* 2: 106-109, 2003.
2. ALLEN, G.: Cerebellar contributions to autism spektrum disorders. *Clinical Neuroscience Research* 6: 195-207, 2006.
3. AMBLER, Z.: *Základy neurologie*. Galén, Praha, 351 s., 2011. ISBN 978-80-7262-707-3.
4. AMBLER, Z., BEDNAŘÍK, J., RŮŽIČKA, E.: *Klinická neurologie - část obecná*. Triton s.r.o., Praha, 975 s., 2004. ISBN 978-80-7387-157-4.
5. AMBROSI, G., FLACE, P., LORUSSO, L., GIROLAMO, F., RIZZI, A., BOSCO, L., ERREDE, M., VIRGINTINO, D., RONCALI, L., BENAGIANO, V.: Non-traditional large neurons in the granular layer of the cerebellar cortex. *Eur J Histochem* 51: 59-64, 2007.
6. ARAKI, K., MEGURO, H., KUSHIYA, E., TAKAYAMA, C., INOUE, Y., MISHINA, M.: Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1267-1276, 1993.
7. BAURLE, J., KRANDA, K., FRISCHMUTH, S.: On the variety of cell death pathways in the Lurcher mutant mouse. *Acta Neuropathol* 112: 691-702, 2006.
8. BENJAMINI, Y., HOCHBERG, Y.: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 57: 289–300, 1995.
9. BOURIN, M., PETIT-DEMOULIÈRE, B., DHONNCHADHA, B.N., HASCÖET, M.: Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 21: 567-74, 2007.
10. BURNHAM, K.P., ANDERSON, D.: *Model Selection and Multi-Model Inference*. Springer, New York. 2003.
11. CADDY, K.W.T., BISCOE, T.J.: Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 287: 167-201, 1979.
12. CASTON, J., VASSEUR, F., STELZ, T., CHIANALE, C., DELHAYE-BOUCHAUD, N., MARIANI, J.: Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Dev Brain Res* 86: 311-316, 1995.
13. CENDELÍN, J., VOLLER, J., VOŽEH, F.: Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration. *Behav Brain Res* 210: 8-15, 2010.
14. CENDELÍN, J., TŮMA, J., KORELUSOVA, I., VOŽEH, F.: The effect of genetic background on behavioral manifestation of Grid2 mutation. *Behav Brain Res* 271: 218-227, 2014.
15. CORE TEAM R: *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2017.
16. COUTELIER, M., BURGLEN, L., MUNDWILLER, E., ABADA-BENDIB, M., RODRIGUEZ, D., CHANTOT-BASTARAUD, S., ROUGEOT CH., COURNELLE, M., MILH, M., TOUTAIN, A., BACQ, D., MEYER, V., AFENJAR, A., DELEUZE, J., BRICE, A., HÉRON, D., STEVANIN, G., DURR, A.: GRID2 mutations span from congenital to mild adult-onset cerebellar ataxia. *Neurology* 84: 1751–1759, 2015.

17. CRIPPA, A., DEL VECCHIO, G., BUSTI CECCARELLI, S., NOBILE, M., ARRIGONI, F., BRAMBILLA, P.: Cortico-Cerebellar Connectivity in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know So Far? *Frontiers in Psychiatry* 7: 20, 2016.
18. ČIHÁK, R.: *Anatomie 3*. Praha: Grada Publishing, 832 s., 1997. ISBN 80-7169-140-2.
19. DICKSON, P. E., ROGERS, T. D., DEL MAR, N., MARTIN, L. A., HECK, D., BLAHA, C. D., GOLDOWITZ, D., MITTLEMAN, G.: Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss. *Neurobiology of Learning and Memory* 94: 220-228, 2010.
20. DUMESNIL-BOUSEZ, N., SOTELO, C.: Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *J Neurocytol* 21: 506–529, 1992.
21. FERNANDEZ-GONZALEZ, A., LA SPADA, A.R., TREADAWAY, J., HIGDON, J.C., HARRIS, B.S., SIDMAN, R.L., MORGAN, J.I., ZUO, J.: Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 295: 1904–1906, 2002.
22. FORDYCE, D.E., WEHNER, J.M.: Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res* 619: 111–119, 1993.
23. FORTIER, P., SMITH, A.M., ROSSIGNOL, S.: Locomotor deficits in the cerebellar mutant mouse, Lurcher. *Exp Brain Res* 66: 271-286, 1987.
24. FREDERIC, F., CHAUTARD, T., BROCHARD, R., CHIANALE, C., WOLLMAN, E., OLIVER, C., DELHAYE-BOUCHAUD, N., MARIANI, J.: Enhanced endocrine response to novel environment stress and endotoxin in Lurcher mutant mice. *Neuroendocrinology* 66: 341-347, 1997.
25. GO´MEZ-PINILLA, F., SO, V., KESSLAK, J.P.: Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res* 904: 13–19, 2001.
26. GOODLETT, R.C., HAMRE, K.M., WEST, J.R.: Dissociation of spatial navigation and visual guidance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Behav Brain Res* 47: 129-141, 1992.
27. GREALY, M.A., JOHNSON, D.A., RUSHTON, S.K.: Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. *Arch Phys Med Rehabil* 80: 661–667, 1999.
28. HILBER, P., JOUEN, F., DELHAYE-BOUCHAUD, N., MARIANI, J., CASTON, J.: Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in learning and retention of a spatial task: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Behav Genet* 28: 299-308, 1998.
29. HILBER, P., CASTON, J.: Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging. *Neuroscience* 102: 615-623, 2001.
30. HILBER, P., LORIVEL, T., DELARUE, C., CASTON, J.: Stress and anxious-related behaviors in Lurcher mutant mice. *Brain Res* 1003: 108-112, 2004.
31. HILLS, B., MASRI, A., KONNO, K., KAKEGAWA, W., LAM, A. N., LIM-MELIA, E., CHANDY, N., HILL, S. R., PARTLOW, J. N., AL-SAFFAR, M., NASIR, R., STOLER, J. M., BARKOVICH, A. J., WATANABE, M., YUZAKI, M., MOCHIDA, G. H.: Deletions in *GRID2* lead to a recessive syndrome of cerebellar ataxia and tonic upgaze in humus. *Neurology* 81: 1378–1386, 2013.
32. CHENG, S.S., HEINTZ, N.: Massive loss of mid- and hindbrain neurons during embryonic development of homozygous Lurcher mice. *J Neurosci* 17: 2400-2407, 1997.

33. ILG, W., BRÖTZ, D., BURKARD, S., ET AL.: Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord* 25: 2239–2246, 2010.
34. ITO, M.: Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 9: 304–313, 2008.
35. KAWATO, M., FURUKAWA, K., SUZUKI, R.: A hierarchical neural-network model for control and learning of voluntary movement. *Biol Cybern* 57: 169–185, 1987.
36. KEMPERMANN, G., KUHN, H.G., GAGE, F.H.: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493–495, 1997.
37. KLOOS, A.D., FISHER, L.C., DETLOFF, M.R., HASSENZAHL, D.L., BASSO, D.M.: Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology* 191: 251–265, 2005.
38. KONARSKI, J. Z., MCINTYRE, R. S., GRUPP, L. A., KENNEDY, S. H.: Is the cerebellum relevant in the circuitry of neuropsychiatric disorders? *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 30: 178–186, 2005.
39. LALONDE, R.: Motor learning in Lurcher mutant mice. *Brain Res* 639: 351–353, 1994.
40. LALONDE, R., STRAZIELLE, C.: Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: Behavior and neurochemistry. *Brain Res* 1140: 51–74, 2007.
41. LISTER, R.G.: The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)* 92: 180–185, 1987.
42. LISTER, R.G.: Ethnologically-based animal model sof anxiety disorders. *Pharmacological Theory* 46: 321–340, 1990.
43. LORIVEL, T., HILBER, P.: Effects of chlordiazepoxide on the emotional reactivity and motor capacities in the cerebellar Lurcher mutant mice. *Behav Brain Res* 173: 122–128, 2006.
44. LORIVEL, T., ROY, V., HILBER, P.: Fear-related behaviors in Lurcher mutant mice exposed to a predator. *Genes brain behav* 13: 794–801, 2014.
45. LUO, D., GANESH, S. & KOOLAARD, J.: Predictmeans: calculate predicted means for linear models. R package version 0.99. 2014.
<http://CRAN.R-project.org/package=predictmeans>.
46. MASOPUST, J., ŘÍHOVÁ, Z., URBAN, A., ZUMROVÁ, A.: Kognitivní a emoční změny u spinocerebelární ataxie. *Psychiatrie pro praxi* 6: 297–301, 2005.
47. MIYAI, I., ITO, M., HATTORI, N., ET AL.: Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. *Neurorehabil Neural Repair* 26: 515–522, 2012.
48. MOLTENI, R., YING, Z., GO´MEZ-PINILLA, F.: Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci* 16: 1107–1116, 2002.
49. MOLTENI, R., WU, A., VAYNMAN, S., YING, Z., BARNARD, R.J., GOMEZ-PINILLA, F.: Exercise reverses the effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 123: 429–440, 2004.
50. MONNIER, C., LALONDE, R.: Elevated +-maze and hole-board exploration in Lurcher mutant mice. *Brain Res* 702: 169–172, 1995.
51. MOSTOFSKY, S. H., REISS, A. L., LOCKHART, P., DENCKLA, M. B.: Evaluation of cerebellar size in attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of Child Neurology* 13: 434–439, 1998.

52. MULLEN, R.J., EICHER, E.M., SIDMAN, R.L.: Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Nat Acad Sci USA* 73: 208-212, 1976.
53. MYSLIVEČEK, J.: *Základy neurovědy*. Triton, Praha, 346 s., 2003. ISBN 8072542346.
54. PATTERSON, S.L., GROVER, L.M., SCHWARTZKROIN, P.A. AND BOTHWELL, M.: Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9: 1081-1088, 1992.
55. PHILLIPS, R.J.S.: "Lurcher", a new gene in linkage group XI of the house mouse. *J Genet* 57: 35-42, 1960.
56. PINHEIRO, J., BATES, D., DEBROY, S., SARKAR D., R CORE TEAM: nlme: linear and nonlinear mixed effects models. 2014.
<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>.
57. PORRAS-GARCIA, E., CENDELÍN, J., DOMINGUEZ-DEL-TORO, E., VOŽEH, F., DELGADO-GARCIA, J.M.: Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice. *Eur J Neurosci* 21: 979-988, 2005.
58. PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M.: Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732, 1977.
59. RESIBOIS, A., CUVELIER, L., GOFFINET, A.: Abnormalities in the cerebellum and brainstem in homozygous Lurcher mice. *Neuroscience* 80: 175-190, 1997.
60. ROGERS, T.D., DICKSON, P.E., MCKIMM, E., HECK, D.H., GOLDOWITZ, D., BLAHA, C.D., MITTLEMAN, G.: Reorganization of circuits underlying cerebellar modulation of prefrontal cortical dopamine in mouse models of autism spectrum disorder. *Cerebellum* 12: 547-556, 2013.
61. SAKAI, Y., KUMANO, H., NISHIKAWA, M., SAKANO, Y., KAIYA, H., IMABAYASHI, E., OHNISHI, T., MATSUDA, H., YASUDA, A., SATO, A., DIKSIC, M., KUBOKI, T.: Cerebral glucose metabolism associated with a fear network in panic disorder. *Neuroreport* 16: 927-931, 2005.
62. SCHMAHMANN, J.D., SHERMAN, J.C.: Cerebellar cognitive affective syndrome. *Int Rev Neurobiol* 41: 433-440, 1997.
63. SCHMAHMANN, J.D., SHERMAN, J.C.: The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121:561-579, 1998.
64. SWERDLOW, N.R., WEBER, M., QU, Y., LIGHT, G.A., BRAFF, D.L.: "Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research". *Psychopharmacology* 199: 331-88, 2008.
65. SWISHER, D.A., WILSON, D.B.: Cerebellar histogenesis in the lurcher (Lc) mutant mouse. *J Comp Neurol* 173: 205-218, 1977.
66. TARONI, F., CHIAPPARINI, L., MARIOTTI, C.: Autosomal dominant spinocerebellar ataxias and episodic ataxias. In *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. 1st edition. Edited by: Manto, M., Gruol, DL., Schmahmann, JD., Koibuchi, N., Rossi, F. New York: *Springer Science+Business Media*; 2193-2267, 2013.
67. TŮMA, J., KOLÍŇKO, Y., VOŽEK, F., CENDELÍN, J.: Mutation-related differences in exploratory, spatial, and depressive-like behavior in pcd and Lurcher cerebellar mutant mice. *Front Behav Neurosci* 9: 116, 2015.
68. TŮMA, J., KOLÍŇKO, Y., JELÍŇKOVÁ, D., HILBER, P., CENDELÍN, J.: Impaired spatial performance in cerebellar-deficient Lurcher mice is not associated with their abnormal stress response. *Neurobiol Learn Mem* 140: 62-70, 2017.

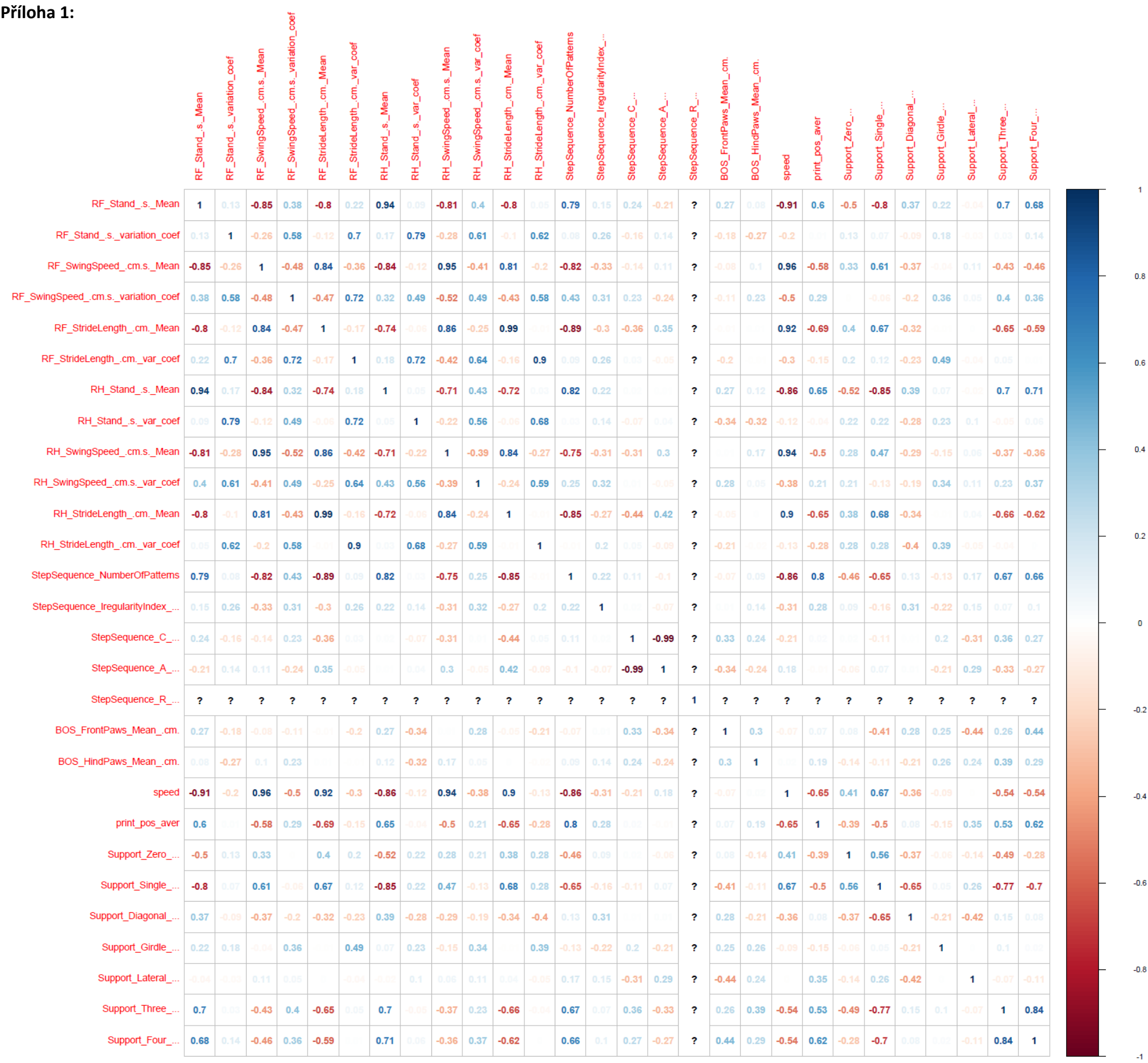
69. VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., GAGE, F.H.: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2: 266–270, 1999.
70. VAYNMAN, S., YING, Z., GOMEZ-PINILLA, F.: Interplay between BDNF and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122: 647–657, 2003.
71. VAYNMAN, S., YING, Z., GOMEZ-PINILLA, F.: Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20: 2580–2590, 2004.
72. VAYNMAN, S., YING, Z., WU, A., GOMEZ-PINILLA, F.: Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience* 139: 1221–1234, 2006.
73. VOGEL, M.W., CASTON, J., YUZAKI, M., MARIANI, J.: The Lurcher mouse: Fresh insights from an old mutant. *Brain Res* 1140: 4–18, 2007.
74. VOŽEH, F.: Jan Evangelista Purkyně a mozeček dříve a dnes. *Živa* 5: 229–233, 2011.
75. WALF, A.A., FRYE, C.A.: The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2: 322–328, 2007.
76. WEI, T.: Package ‘corrplot’ – Visualization of a correlation matrix. 2012.
<https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/index.html>.
77. WESTIN, J.E.; JANSSEN, M.L.F.; SAGER, T.N.; TEMEL, Y.: Automatic gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy. *Behav Brain Res* 226: 519–528, 2012.
78. WETTS, R., HERRUP, K.: Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in lurcher chimeric mice. I. Qualitative studies. *J Embryol Exp Morphol* 68: 87–98, 1982a.
79. WETTS, R., HERRUP, K.: Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in lurcher chimeric mice. II. Granule cell death. *Brain Res* 250: 358–362, 1982b.
80. YUE, Z., HORTON, A., BRAVIN, M., DEJAGER, P.L., SELIMI, F., HEINTZ, N.: A novel protein complex linking the d2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in Lurcher mice. *Neuron* 35: 921–933, 2002.
81. ZANJANI, H.S., MCFARLAND, R., CAVELIER, P., BLOKHIN, A., GAUTHERON, V., LEVENES, C., BAMBRICK, L.L., MARIANI, J., VOGEL, M.W.: Death and survival of heterozygous Lurcher Purkinje cells in vitro. *Dev Neurobiol* 69: 505–517, 2009.
82. ZUO, J., DE JAGER, P. L., TAKAHASHI, K. A., JIANG, W., LINDEN, D. J., HEINTZ, N.: Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388: 769–773, 1997.

9. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících míru vzájemných korelací parametrů chůze u systému CatWalk. Korelace byly vypočteny uvnitř skupiny myší typu wild kmene B6CBA.

Příloha 2: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících míru vzájemných korelací parametrů chůze u systému CatWalk. Korelace byly vypočteny uvnitř skupiny myší Lurcher kmene B6CBA.

Příloha 1:



Příloha 2:

